Manejo e sanidade de peixes em cultivo

Marcos Tavares-Dias
Organizador

Embrapa Amapá
Macapá
2009

Exemplares desta publicação podem adquiridos na: Embrapa Amapá. Rodovia Juscelino Kubitschek, km 5, N° 2600, CEP: 68903-419 - Macapá, Amapá, Brasil. Fone/Fax: (96)xx4009-9501.
sac@cpafap.embrapa.br
www.cpafap.embrapa.br

Organização Editorial: Marcos Tavares-Dias

Revisão Gramatical: Elisabete da Silva Ramos

Ficha Catalográfica e Normalização: Andréa Liliane Pereira da Silva

Capa e Diagramação Eletrônica: Márcio Wendel de Lima Néri

Multimídia CD: Ricardo Santos Costa

1ª Edição (2009) – Tiragem de 1.000 exemplares

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca da Embrapa Amapá, Macapá, AP, Brasil)

Manejo e sanidade de peixes em cultivo [recurso eletrônico] / Marcos Tavares-Dias, Organizador. Macapá: Embrapa Amapá, 2009.
1 CD-ROM.

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

1. Aquicultura 2. Manejo 3. Cultivo 4. Sanidade. I. Tavares-Dias, Marcos, *org.*

CDD 21 ed. 639

ISBN: 978-85-61366-01-8

Depósito legal na Biblioteca Nacional

Publicado no Brasil/Publicated in Brazil

Listas de autores

Adriano Teixeira de Oliveira
Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Avenida Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 3000, Coroado, 69700-000 - Manaus, AM, Brasil.
ateixeira@ufam.edu.br

Alexandre Nizio Maria
Embrapa Tabuleiros Costeiros. Avenida Beira Mar, 3250, 49025-040 - Aracaju, Sergipe, Brasil.
niziomaria@gmail.com

Ana Lúcia Silva Gomes
Centro Universitário Nilton Lins, Laboratório de Zoologia Aplicada. Avenida Professor Nilton Lins, 3259. Parque das Laranjeiras, 69058-040 - Manaus, Amazonas, Brasil.
anapaima@yahoo.com.br

Angela Maria Bezerra Varella
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Avenida André Araújo, 2936, Aleixo, 69060-001 - Manaus, Amazonas, Brasil.
avarella@pq.cnpq.br

Araceli Hackbarth
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Departamento de Genética e Evolução. Rodovia Washington Luiz Km 235, 13565-905 - São Carlos, São Paulo, Brasil.
arinhahack@yahoo.com.br

Barbarella de Matos Macchi
Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular. Avenida Augusto Corrêa s/n, Bairro Guamá, 66075-110 - Belém, Pará, Brasil.
bmmacchi@yahoo.com

Bernardo Baldisserotto
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Fisiologia e Farmacologia. 97105-900 - Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.
bernardo@smail.ufsm.br

Bruno Adan Sagratzki Cavero
Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Agrárias, Departamento de Ciências Pesqueiras. Avenida Rodrigo Otavio Jordão Ramos, 3000, Coroado I, 69700-000 – Manaus, Amazonas, Brasil.
basc@ufam.edu.br

Carlos P. Dopazo
Universidad de Santiago de Compostela, Instituto de Acuicultura, Departamento de Microbiología - Espanha.
carlos.pereira@usc.es

Carolina Flores-Quintana
Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Ictiología. Sargento Cabral, 2139, Caixa Postal: 3400 – Corrientes, Argentina.
carolina@vet.unne.edu.ar

Cesar Santos
Embrapa Amapá. Rodovia Juscelino Kubitschek, km 5, N° 2600, Universidade, 68903-419 - Macapá, Amapá, Brasil.
cesar@cpafap.embrapa.br

Cleujosí da Silva Nunes
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Departamento de Genética e Evolução. Rodovia Washington Luiz, Km 235, 13565-905 - São Carlos, São Paulo, Brasil.
cleujosi@yahoo.com.br

Cleusa Suzana Oliveira Araújo
Centro Universitário Nilton Lins, Laboratório de Zoologia Aplicada. Avenida Professor Nilton Lins, 3259, Parque das Laranjeiras, 69058-040 - Manaus, Amazonas, Brasil.
suzana.araujo@pq.cnpq.br

Edsandra Campos Chagas
Embrapa Amazônia Ocidental. Caixa Postal: 319, 69011-970 - Manaus, Amazonas, Brasil.
edsandra.chagas@cpaa.embrapa.br

Eduardo Akifumi Ono
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Coordenação de Pesquisas em Aquicultura (CPAQ). Avenida André Araújo, 2936, Aleixo, 69060-001 - Manaus, Amazonas, Brasil.
onoedu@yahoo.com

Eduardo Makoto Onaka
Instituto de Pesca-APTA-SAA. Caixa Postal: 1052, 15025-970 - São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.
onakaem@pesca.sp.gov.br

Elenice Martins Brasil
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Coordenação de Pesquisas em Aquicultura (CPAQ). Avenida André Araújo, 2936, Aleixo, 69060-001 - Manaus, Amazonas, Brasil.
nicebrasil@hotmail.com

Eliane Tie Oba
Embrapa Amapá. Rodovia Juscelino Kubitschek, km 5, N° 2600, Universidade, 68903-419 - Macapá, Amapá, Brasil.
eliane@cpafap.embrapa.br

Elizabeth Gusmão Affonso
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Coordenação de Pesquisas em Aquicultura (CPAQ). Avenida André Araújo, 2936, Aleixo, 69060-001 - Manaus, Amazonas, Brasil.
pgusmao@inpa.gov.br

Fabiana Cavichiolo
Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Faculdade de Ciências Agrárias. Rodovia Dourados-Itaum, km 12, Caixa Postal: 533, 79804-970 - Dourados, Mato Grosso do Sul.
fbcavica@hotmail.com

Fabiana Pilarski
Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp). Via Professor Paulo Donato Castellane, km 05, 14884-900 - Jaboticabal, São Paulo, Brasil.
fabianap@caunesp.unesp.br

Fabiana Satake
Centro Universitário da Grande Dourados, Curso de Medicina Veterinária. Rua Balbina Matos, 2121, Jardim Universitário, 79824-900, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.
fabsatake@yahoo.com.br

Fabio de Jesus Castro
Instituto Tocantinense Presidente Antônio Carlos (ITPAC), Faculdade de Ciências Humanas, Econômicas e da Saúde de Araguaína (FAHESA). Avenida Filadélfia, 568, Setor Oeste, 77816-540 - Araguaína, Tocantins, Brasil.
fabiuscastrus@yahoo.com.br

Fernando Fabrizzi
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Departamento de Genética e Evolução. Rodovia Washington Luiz, Km 235, 13565-905 - São Carlos, São Paulo, Brasil.
ferfabrizzi@hotmail.com

Flávia Pinheiro de Barros
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Coordenação de Pesquisas em Aquicultura (CPAQ). Avenida André Araújo, 2936, Aleixo, 69060-001 - Manaus, Amazonas, Brasil.

Flávio Ruas de Moraes
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV-Unesp), Departamento de Patologia Veterinária e Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp). Via Professor Paulo Donato Castellane, km 05, 14884-900 - Jaboticabal, São Paulo, Brasil.
fruas@fcav.unesp.br

Gabriela Tomas Jerônimo
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Aquicultura. Rodovia Admar Gonzaga, 1346, 88040-00 - Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.
gabriela@cca.ufsc.br

Gilberto Moraes
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Departamento de Genética e Evolução. Rodovia Washington Luiz, Km 235, 13565-905 - São Carlos, São Paulo, Brasil.
gil@ufscar.br

Gustavo A. Arbeláez-Rojas
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Departamento de Genética e Evolução. Rodovia Washington Luiz, Km 235, 13565-905 - São Carlos, São Paulo, Brasil.
matamba2@yahoo.com.br

Gustavo Viozzi
Centro Regional Universitario Bariloche (CRUB), Laboratorio de Parasitología (LAPAR), INIBIOMA (Universidad Nacional del Comahue (CONICET). Quintral 1250 (8400) - Bariloche, Argentina.
gviozzi@crub.uncoma.edu.ar

Haluko Massago
Centro de Aqüicultura da Unesp (Caunesp). Via Professor Paulo Donato Castellane, km 05, 14884-900 - Jaboticabal, São Paulo, Brasil.
hmassago@yahoo.com.br

Hymerson Costa Azevedo
Embrapa Tabuleiros Costeiros. Avenida Beira Mar, 3250, 49025-040 - Aracaju, Sergipe, Brasil.
hymerson@cpatc.embrapa.br

Isabel Bandín
Universidad de Santiago de Compostela, Instituto de Acuicultura, Departamento de Microbiologia - Espanha.
isabel.bandin@usc.es

Jefferson Raphael Gonzaga de Lemos
Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Avenida Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 3000, Coroado, 69700-000 - Manaus, AM, Brasil.
jefraphael@yahoo.com.br

José Celso de Oliveira Malta
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Avenida André Araújo, 2936, Aleixo, 69060-001 - Manaus, Amazonas, Brasil.
jcmalta@inpa.gov.br

José Luiz Martins do Nascimento
Universidade Federal do Pará (UFPA), Laboratório de Neuroquímica, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Biológicas. Avenida Augusto Corrêa S/N, Bairro Guamá, 66075-110 - Belém, Pará, Brasil.
jlmn@ufpa.br

Julieta Rodini Engracia de Moraes
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV-Unesp), Departamento de Patologia Veterinária e Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp). Via Professor Paulo Donato Castellane, km 05, 14884-900 - Jaboticabal, São Paulo, Brasil.
julietamoraes@gmail.com

Laila Romagueira Bichara dos Santos
Universidade de São Paulo, ICB-I.Avenida Professor Lineu Prestes, 1524, Cidade Universitária, 05508-900 - São Paulo, São Paulo, Brasil.
lailarbs@icb.usp.br

Lauro Vargas
Universidade Estadual de Maringá (UEM), Departamento de Zootecnia. Avenida Colombo, 5790, Bloco J 45, Sala 23, 87.020-900 – Maringá, Paraná, Brasil.
lvargas@uem.br

Lenise Vargas Flores da Silva
Universidade Federal do Pará, Faculdade de Ciências Biológicas, Campus de Santarém. Rua Marechal Rondon, s/n, Bairro Caranazal, 68070-040 – Santarém, Pará, Brasil.
lenisesilva@ufpa.br

Liliana Semenas
Centro Regional Universitario Bariloche (CRUB), Laboratorio de Parasitología (LAPAR), INIBIOMA (Universidad Nacional del Comahue (CONICET). Quintral 1250 (8400) - Bariloche, Argentina.
lsemenas@crub.uncoma.edu.ar

Márcia Mayumi Ishikawa
Embrapa Agropecuária Oeste, Laboratório de Piscicultura. BR 163, km 253, Caixa Postal: 661, 79804-970 - Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.
marcia@cpao.embrapa.br

Marcos Tavares-Dias
Embrapa Amapá. Rodovia Juscelino Kubitschek, km 5, N° 2600, Universidade, 68903-419 - Macapá, Amapá, Brasil.
marcostavares@cpafap.embrapa.br

Maria Anete Leite Rubim
Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Agrárias, Departamento de Ciências Pesqueiras. Avenida Rodrigo Otavio Jordão Ramos, 3000, Coroado I, 69700-000 – Manaus, Amazonas, Brasil.
aneterubim@ufam.edu.br

Maria Lucia da Silva Ribeiro
Universidade Federal do Pará (UFPA), Faculdade de Farmácia, Instituto de Ciências da Saúde. Avenida Augusto Corrêa s/n, Bairro Guamá, 66075-110 e Universidade da Amazônia (UNAMA). Avenida Alcindo Cacela, 287, Umarizal, 66060-902 - Belém, Pará, Brasil.
maluisa.ribeiro@hotmail.com

Marisa Narciso Fernandes
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Departamento de Ciências Fisiológicas, Laboratório de Morfologia Funcional. Rodovia Washington Luiz, Km 235, 13565-905 - São Carlos, São Paulo, Brasil.
dmnf@power.ufscar.br

Maurício Laterça Martins
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Aquicultura. Rodovia Admar Gonzaga, 1346, 88040-00 - Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.
mlaterca@cca.ufsc.br

Mónica Pérez Gianeselli
Instituto de Ictiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Sargento Cabral, 2139, Caixa Postal: 3400 – Corrientes, Argentina.
mopeg19@vet.unne.edu.ar

Paulo César Falanghe Carneiro
Embrapa Tabuleiros Costeiros. Avenida Beira Mar, 3250, 49025-040 - Aracaju, Sergipe, Brasil.
paulo@cpatc.embrapa.br

Renato Augusto DaMatta
Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Centro de Biociências e Biotecnologia, Laboratório de Biologia Celular e Tecidual. Avenida Alberto Lamego 2000, Parque Califórnia, 28013-602 - Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.
renato@uenf.br

Ricardo Pereira Ribeiro
Universidade Estadual de Maringá (UEM), Departamento de Zootecnia. Avenida Colombo, 5790, Bloco J 45, Sala 23, 87.020-900 – Maringá, Paraná, Brasil.
rpribeiro@uem.br

Róberson Sakabe
Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp). Via Professor Paulo Donato Castellane, km 05, 14884-900 - Jaboticabal, São Paulo, Brasil.
rsakabe@yahoo.com.br

Rubén Daniel Tanzola
Universidad Nacional del Sur, Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos (POA). San Juan 670 (8000) - Bahía Blanca, Argentina.
rtanzola@uns.edu.ar

Sandro Loris Aquino-Pereira
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Avenida André Araújo, 2936, Aleixo, 69060-001 - Manaus, Amazonas, Brasil.
sloris@inpa.gov.br

Sanny Maria Sampaio Andrade
Centro Universitário Nilton Lins, Laboratório de Zoologia Aplicada. Avenida Professor Nilton Lins, 3259, Parque das Laranjeiras, 69058-040 - Manaus, Amazonas, Brasil.
sanny@interlins.com.br

Santiago Benites de Pádua
Faculdade Anhanguera de Dourados. Rua Manoel Santiago, 1775 - Vila São Luis, 79925-150 - Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.
santiago_psb@hotmail.com

Sérgio Henrique Canello Schalch
Pólo Regional do Noroeste Paulista - APTA-SAA, Caixa Postal: 61, 15500-000 – Votuporanga, São Paulo, Brasil.
sschalch@apta.sp.gov.br

Tecia Maria Ulisses de Carvalho
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer. Ilha do Fundão. 21941-590 - Rio de Janeiro, Brasil.
tecia@biof.ufrj.br

Thiago El Hadi Perez Fabregat
Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp). Via Professor Paulo Donato Castellane, km 05, 14884-900 - Jaboticabal, São Paulo, Brasil.
thiagofabregat@hotmail.com

Thiago Marinho Pereira
Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Agrárias, Departamento de Ciências Pesqueiras. Avenida Rodrigo Otavio Jordão Ramos, 3000, Coroado I, 69700-000 – Manaus, Amazonas, Brasil.
marinho_thiago@hotmail.com

Wagner dos Santos Mariano
Faculdades Anhanguera. Rua Manoel Santiago, 1775, Vila São Luiz, 79825-150 - Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.
wagnermariano14@hotmail.com

Wanessa Ribeiro Cruz
Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Avenida Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 3000 - Manaus, Amazonas, Brasil.
wanessarc@hotmail.com

Sumário

Apresentação

As instituições e cientistas que se dedicam às pesquisas envolvendo a aquicultura, atividade que é multidisciplinar, especialmente a piscicultura, devem promover iniciativas para maximizar esforços de publicação de estudos que abordam o manejo e a sanidade de peixes, como forma de inserção em uma ordem mundial que prima pelo uso coletivo de novos meios de propagação do conhecimento científico.

A motivação para a Embrapa Amapá colocar em prática este conceito surgiu durante as discussões em torno da preparação do "I Seminário de Aquicultura do estado do Amapá: Boas Práticas de Manejo para a Saúde de Peixes", de uma sequência anual de três eventos planejados para ocorrer em Macapá (AP, Brasil). O primeiro, programado para 9 e 10 de junho de 2009, reuniu diversos pesquisadores da Embrapa e de outras instituições de pesquisa da Amazônia, bem como de outras regiões do Brasil, além de gestores públicos federal e estadual, todos especialistas em questões relacionadas diretamente ao tema central do evento, muitos deles focados no manejo e sanidade de peixes.

Durante o planejamento deste I Seminário de Aquicultura, percebeu-se a necessidade de formatar um produto com informações atualizadas e sistematizadas sobre os diversos temas a serem abordados durante o evento. Optou-se então por organizar temas relativos às práticas de manejo relevantes para a manutenção da saúde de peixes em cativeiro, na forma de um livro eletrônico. Assim, foi solicitado a diversos pesquisadores contribuições sobre alimentação, produção, reprodução, fisiologia, parasitologia, patologia, e outros, na forma de capítulos para o livro "Manejo e Saúde de Peixes em Cultivo".

Os autores desta obra são, portanto, 62 pesquisadores de diversas instituições públicas e privadas do Brasil e do exterior (Espanha e Argentina), os quais forneceram na forma de capítulos inéditos, parte de suas experiências práticas e experimentais voltadas para a aquicultura. Além dessa contribuição, alguns pesquisadores também participaram do seminário como palestrantes e/ou moderadores dos debates programados sobre piscicultura.

O livro "Manejo e Saúde de Peixes em Cultivo", está constituído por 24 capítulos e aborda informações relevantes para a produção de peixes, direcionadas não apenas aos atores diretamente envolvidos na cadeia produtiva de peixes, mas também aos estudantes de graduação e pós-graduação que pretendem direcionar suas atividades profissionais para a aquicultura, principalmente a piscicultura.

Marcos Tavares-Dias
Embrapa Amapá (Macapá/AP)

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 1

Aquicultura e pesca: a mudança do modelo exploratório

Cesar Santos

Resumo
A pesca é uma das atividades mais antigas da história humana. Sua arte tem sido praticada desde os tempos pré-históricos. Embora não tão antiga quanto a pesca, a aquicultura também é uma arte milenar, os registros apontam essa prática com surgimento entre 4 a 5 mil anos atrás. A pesca e a aquicultura tem relevante papel social, seja de maneira direta ou indireta, pois ambas são meios de subsistência fundamentais de diversas comunidades no mundo todo. Atualmente, com a sobreexploração de diversos estoques pesqueiros e o aumento da população mundial, a demanda por alimentos tornou-se ainda maior. Nesse contexto, a aquicultura surge como o sistema produtivo que poderá repor as perdas da atividade pesqueira, garantido assim a seguridade alimentar do planeta.

Abstract
Fishing is one of the oldest activities of human history. Since prehistoric times its art has been practiced. Although not as old as fishing, the aquaculture is also an ancient art, because the reports indicate this practice beginning there is 4 to 5 thousand years ago. As much fishing as aquaculture have important social role, either directly or indirectly, plays role in the livelihoods of many communities worldwide. Currently, due to overexploitation of many fish stocks, as well as increasing world population, the demand for food has also become greater. In this context, the aquaculture has emerged as the production system that will replace the loss of fishing activity, ensuring the food security of the planet.

Introdução

Há um debate no mundo científico, sobre se o homem foi primeiro caçador e depois pescador ou vice versa. O fato, deixando de lado o debate, é que a pesca é uma das atividades mais antigas da história humana. Sua arte tem sido praticada desde os tempos pré-históricos; sendo que, a primeira evidência arqueológica da pesca, elaborados arpões entalhados, foram encontrados em sítios datando de 80.000 anos atrás, não muito depois do surgimento do *Homo sapiens* (Pauly, 2002). Ela existe desde que o homem em sua busca por recursos alimentares, para suprir uma demanda cada vez maior de proteína, começou a diversificar seus hábitos alimentares.

Em seu estágio inicial a humanidade foi dominada pela natureza. Entre 50 e 40 mil anos atrás, caçadores e coletores apresentavam técnicas rudimentares, tendo o nomadismo sem acumulação de bens como principal modo de vida. A organização, tanto das pequenas comunidades como do tempo era primitiva. Com o surgimento da agricultura (10 mil anos atrás), há o domínio das técnicas por todos os membros da comunidade. O modo de vida torna-se sedentário, havendo o aparecimento de regras, chefias, com organização política e temporal, marcada por períodos de plantio e colheita (Krüger, 2001). Neste contexto, o esboço da atividade pesqueira tal como a conhecemos hoje, já poderia ser vislumbrada; com a prática da pesca fazendo parte do cotidiano das comunidades que habitavam as margens de rios, lagos e mares.

De 10 mil atrás aos dias atuais, muita mudou e evoluiu na arte da pesca, uma dessas evoluções é certamente a aquicultura. Pode-se dizer que com a consolidação da pesca, houve então o surgimento da aquicultura. Isso também, graças ao gênio inventivo e a tenacidade humana. Embora não tão antiga quanto a pesca, a aquicultura também é uma arte milenar. Os registros apontam sua prática para 4-5 mil anos de história, aproximadamente 2.500 a.C., quando inicialmente os chineses praticavam o cultivo de carpas além de outros organismos aquáticos, incluindo moluscos, crustáceos e plantas.

Manter peixes em cativeiro e alimentá-los é uma tarefa que o ser humano realiza há muito tempo. No principio, as pessoas ricas e com poder faziam isto para ter peixe fresco e, possivelmente, por diversão. As pessoas pobres faziam para armazenar a abundância de uma temporada e utilizar posteriormente em períodos de escassez. A aquicultura nasceu quando os lares rurais se deram conta de que a criação de peixes constituía um elemento válido em sua estratégia de sobrevivência e subsistência (FAO, 2009).

Apesar deste longo histórico, foi somente no último século, quando se aprendeu a controlar a reprodução de algumas espécies de peixes e camarões, que ocorreu o desenvolvimento da aquicultura e sua conversão em interesse de empresas especializadas. Particularmente, foi nos últimos 40 anos que a aquicultura experimentou um significativo incremento, tornando-se na virada do século, a atividade agropecuária que mais cresceu no mundo inteiro (Zimmermann, 2001; FAO, 2009). A produção industrial da aquicultura tornou-se significativa somente a partir dos anos 80 e vem seguindo o mesmo modelo desenvolvido pela filosofia da agricultura industrial, baseado na introdução intensiva de energia e insumos com

produtos voltados para exportação. Este avanço significativo no incremento da produção da aquicultura, mais uma vez esteve vinculado à pesca, como não poderia deixar de ser, demonstrado assim, o forte vínculo e a relação de interdependência entre aquicultura e pesca.

A pesca e a aquicultura adquirem relevante papel social, seja de maneira direta ou indireta, desempenhando um papel fundamental nos meios de subsistência de diversas comunidades no mundo todo, envolvendo milhares de pessoas, seja na pesca profissional ou amadora e na aquicultura profissional e de subsistência. Essa relação pode ainda ser exemplificada de diversas outras maneiras. Desde a necessidade dos produtos descartados pela pesca, o chamado “bycatch” ou descarte, para utilização na fabricação de farinha de peixe e óleo (cerca de 1/3 da pesca marinha mundial é utilizada para este fim), ingredientes essências das rações para aquicultura; passando pela dependência dos espécimes naturais como matrizes nos diferentes tipos de cultivo; e finalizando com a questão do crescimento e desenvolvimento da aquicultura quando se iniciou o colapso da pesca com a diminuição dos estoques pesqueiros (Waldige & Caseiro, 2004; FAO, 2009). Foi justamente em função dessas questões que a aquicultura experimentou um forte incentivo e fomento. Pois o rendimento da pesca, que é um dos sistemas de produção de grande importância para a segurança alimentar do planeta, não vinha sendo mais suficiente para atender à demanda mundial, frente ao crescimento populacional do planeta e novas demandas por uma alimentação saudável baseada numa dieta de frutos do mar. Alguns estoques pesqueiros estavam, e continuam, sob o risco de esgotamento devido a sobrepesca, particularmente aqueles de espécies de grande valor econômico como o salmão e o bacalhau (Jennings et al., 2001; Miller, 2007; Resende et al., 2009; FAO, 2009).

Essas preocupações quanto à segurança alimentar, passaram a ser graves a partir de 1950, quando a comunidade científica manifestou-se sobre a capacidade de sobrepesca das populações naturais de peixes. Sem dúvida, a aquicultura começou a desenvolver-se aproximadamente nessa mesma época, o que para muitos foi tranquilizador, visto que, se manteve a esperança de que no futuro também haveria peixe suficiente para alimentação de todos. Dada à alta probabilidade que os desembarques da pesca de captura se mantenham estagnados, soa muito convidativo pensar na aquicultura como sendo a única forma de aumentar o fornecimento mundial de (FAO, 2009). Então, cabe perguntar: quais perspectivas futuras têm essa atividade?

Para responder essa questão, deve-se buscar entender o vínculo entre pesca, aquicultura e crescimento populacional, através da discussão e compreensão entre as diversas disciplinas relacionadas aos temas, as quais devem, para a solução efetiva dos problemas, enxergar umas as outras como parceiras e não meras “caixas pretas” (Carpenter & Turner, 2000). Somente assim, poderemos referendar o pensamento amplamente difundido na sociedade: que toda possível escassez no fornecimento da pesca de captura, será compensada pela produção da aquicultura.

Exploração pesqueira

A pesca é o terceiro maior sistema produtor de alimentos do mundo, contribuindo com aproximadamente 64% da produção mundial, com exceção da contribuição das plantas aquáticas, tendo alcançado índices recordes de produção em 2004 com aproximadamente 95 milhões de toneladas e decrescendo a 92 milhões de toneladas no ano de 2006 (FAO, 2009). O Brasil, apesar de seu extenso litoral e grande volume de água doce, participa com pouco mais de 0,5% do total, o que equivale a algo em torno de 780 mil toneladas/ano, embora sua atividade pesqueira tenha uma considerável importância social, com o emprego direto de aproximadamente 800 mil pescadores (Ibama, 2008; FAO, 2009).

Na atualidade, a grande dimensão observada na indústria pesqueira iniciou-se após a segunda grande guerra, quando os recursos tecnológicos, oriundos desta, tais como sonares, radares, GPS, etc., foram aplicados à indústria pesqueira para melhoria desta, aumentando assim o potencial de captura dos barcos de pesca. Por conta desse maior potencial de captura, o impacto da pesca tem aumentado consideravelmente desde a industrialização da frota pesqueira no inicio do século XX. Por volta de 1930, os barcos de arrasto a vapor no sudeste do Mar do Norte foram amplamente substituídos por arrasteiros a motor (Jennings et al., 2001). O primeiro barco arrasteiro holandês apareceu em 1910 e seus números foram aumentando a um máximo de mais de 500 navios por volta de 1940. O desenvolvimento de “beam trawling” para linguados e peixes similares iniciou apenas após a segunda guerra mundial, porém seu esforço permaneceu insignificante até o inicio dos anos 60. O numero máximo de arrasteiros ocorreu por volta de 1970, porém o pico do esforço de “beam trawl” ocorreu em 1988, como resultado do aumento no esforço por navio (Philippart, 1998).

Outro ponto que potencializou a exploração pesqueira e que foi crucial para a depleção dos estoques, é o surgimento do incentivo à pesca, através do oferecimento de subsídios governamentais. Neste ponto, levando-se em consideração o atual estado de sobreexploração de diversas espécies, deve-se perguntar: os governos devem continuar a subsidiar os barcos de pesca? Sabe-se que os subsídios dos governos, fornecidos às indústrias de pesca são os principais problemas da sobrepesca. O custo para a indústria de pesca global é da ordem de 120 bilhões de dólares/ano, para pescar o equivalente a 70 bilhões de dólares em peixes. Os subsídios do governo, tais como as isenções de impostos sobre combustível, controle de preços, empréstimos com juros baixos e subsídios para equipamentos de pesca, compõem o déficit anual de 50 bilhões de dólares da indústria (Jennings et al., 2001; Pauly et al., 2003; FAO, 2009). Sem tais subsídios, alguns barcos não poderiam mais pescar, e então o número de peixes e outros recursos pesqueiros capturados atingiria uma produção sustentável.

Esse grande dimensionamento da indústria pesqueira, sem o conhecimento do potencial pesqueiro, o rápido desenvolvimento da pesca com esforço dirigido a poucas espécies, e sem o devido conhecimento técnico-científico da biologia destas espécies; ocasionou o comprometimento de alguns dos principais recursos pesqueiros de diversas regiões do globo, provocando uma diminuição marcante da produção pesqueira de origem marinha, estuarina e dulciaquícola (Jennings et al., 2001; FAO 2006; 2009).

Aliado ao dimensionamento da indústria pesqueira, o tipo de arte de pesca ainda hoje realizada em grande parte das áreas pesqueiras, a pesca de arrasto, contribui para a depleção dos estoques. Este tipo de arte de pesca gera diversos danos ao ambiente marinho, sendo, a constante perturbação do fundo marinho com remoção da infauna bêntica e o descarte ou “bycatch” duas das principais causas deste desgaste (Horsten & Kirkegaard, 2003). Alverson et al. (1994) estimou que 27 milhões de toneladas de “bycatch” são descartadas a cada ano, em comparação com a captura anual desembarcada em torno de 100 milhões de toneladas. A pesca de camarão foi responsável por aproximadamente 35% do descarte da pesca comercial mundial; por todas estas razões, a pesca de camarão é considerada ambientalmente como sendo a menos aceitável (Alverson et al., 1994; Jennings et al., 2001).

O descarte da pesca é constituído em grande parte de peixes jovens e que ainda não atingiram o tamanho de primeira reprodução, consequentemente, esta atividade pode estar contribuindo para a depleção dos estoques pesqueiros na região devido à remoção de indivíduos imaturos. Essa remoção pode causar mudanças na distribuição de tamanho e idade das populações de peixes, consequentemente, isto ocasiona profundos efeitos sobre o processo reprodutivo; uma vez que a fecundidade relativa nos peixes, número de ovos por unidade de massa corpórea, aumenta com o tamanho corporal. Consequentemente, uma população de determinada biomassa possui maior fecundidade potencial quando composta de indivíduos maiores que de indivíduos menores; além disso, quando a duração da vida reprodutiva é artificialmente encurtada pela pesca, o potencial reprodutivo da espécie não é alcançado (Jennings et al., 2001).

Sem uma perspectiva de sustentabilidade, os estoques naturais dos recursos pesqueiros, especialmente peixes, vem sendo paulatinamente deplecionados, refletindo uma gradual redução na captura de peixes de água doce (Zaniboni Filho, 1997; FAO, 2006) e marinhos (Ibama, 2008; FAO, 2009). Aproximadamente, 75% das espécies de peixes marinhos de valor comercial no mundo são pescados em excesso ou até seus limites biológicos. A sobrepesca está consumindo tantos peixes que resta um estoque de reprodutores muito pequeno para manter uma quantidade suficiente da espécie (Miller, 2007). Essa sobrepesca prolongada leva à extinção comercial, ou seja, a população de uma espécie diminui a tal ponto que passa a não ser mais lucrativo pescá-la. Então, os barcos de pesca mudam para uma nova espécie ou uma nova região, esperando que as espécies pescadas em excesso recuperem-se em algum momento.

Essa tendência tem sido acelerada com a atual expansão dos grandes e eficientes barcos de pesca, o que faz com que a maior parte das pescarias costeiras, estuarinas e algumas de ambientes dulciaquícolas estejam totalmente exploradas ou sobreexploradas, devido a um aumento no número de pescadores e/ou desenvolvimento de aparelhos de pesca mais eficientes e mecanização dos barcos. Os efeitos da pesca sobre os organismos, entre outros, inclui: diminuição em sua abundância, mudanças na estrutura etária e composição de tamanho, e mudanças na composição de espécies (Blaber, 2000; Blaber et al., 2000).

Mudança de foco

Os oceanos e mares cobrem cerca de 70% da superfície do planeta e representam 98% do seu volume de água. Proporcionam serviços ecológicos essenciais e estão na base de uma grande variedade de atividades humanas. Oceanos e mares são de grande importância para a economia, na medida em que asseguram, direta ou indiretamente, milhões de empregos não só no setor marítimo, nomeadamente no domínio dos transportes, dos portos, das pescas e da aquicultura, como igualmente nos setores do turismo e da energia. Não menos relevantes são os inúmeros usos sociais, recreativos e culturais que se faz dos oceanos e mares (Paiva, 1996).

Devido a sua imensidão, o mar era considerado pelas populações como uma abundante fonte de riqueza. Durante séculos, e até a primeira metade do século XX, se considerava o mar como um reservatório imortal e inesgotável de recursos pesqueiros que se poderia explorar, mas, nos últimos anos a atividade humana levou os oceanos ao seu limite (FAO, 2009). Hoje, sabe-se que não é assim, embora os oceanos sejam as áreas do globo menos conhecida pelo homem. O crescimento exponencial da industrialização e da exploração dos recursos marinhos ocorrido no século XX desfez o mito de que os oceanos constituem uma fonte inesgotável de recursos.

A antiga e falsa imagem dos oceanos como fonte inesgotável já não era mais plausível. Embora, eles continuem a representar uma fonte particularmente importante de alimentos, respondendo por 16% da oferta de proteína animal em todo o mundo (FAO, 2009); e representem enormes fontes de recursos naturais, como as riquezas depositadas em seu leito. No Brasil, por exemplo, há mais petróleo nas bacias sedimentares da região de Campos e Espírito Santo do que em todo o território nacional, e em escala mundial há diversas substâncias extraídas dos organismos marinhos, utilizadas na produção de remédios, cosméticos e diversos outros produtos industrializados.

Essa mudança de mentalidade em relação aos oceanos foi reforçada por diversos fatores (Figura 1), sendo que o principal deles foi o declínio dos estoques pesqueiros, que forçosamente modificou o modelo exploratório vigente em favor da aquicultura. Isto ocorreu devido à pressão da procura, quando os recursos tornaram-se escassos e, como acontece com todos os bens escassos, aumentou a competição por eles e o valor que lhes era atribuído; tornando então a questão da pesca e aquicultura prioritária sob o ponto de vista ambiental e de seguridade alimentar (Rana, 1997; Swinton, 2005; Miller, 2007).

A produção massiva e rápida de pescado visando atender a uma demanda real por alimento é aspiração legítima e tem forte e justo apelo político. A estratégia para atender a esse anseio deve, entretanto, considerar as implicações ambientais e a viabilidade socioeconômica. Nesse contexto, iniciativas de avaliação das ações tomadas em relação à sobrepesca, conservação dos estoques pesqueiros, sua exploração e a preservação das espécies são oportunas (Naylor et al., 2000; Asche & Tveteras, 2004; Agostinho et al., 2007). De acordo com a FAO (2009), aproximadamente 150 espécies marinhas de valor comercial no mundo sofreram sobrepesca ou foram pescadas até suas produções máximas sustentáveis. Alguns locais de

pesca estão tão esgotados que mesmo se a pesca fosse interrompida de imediato, levaria 20 anos ou mais para que os estoques fossem repostos.

Mudança de mentalidade

Pesca → Aquicultura: fatores de influência

- → Duplicação demográfica dos últimos 50 anos
- → Explosão do crescimento das cidades costeiras.
- → O aumento das atividades econômicas no litoral
- → Declínio dos estoques pesqueiros
- → Riscos associados ao aumento do transporte de mercadorias por mar
- → Degradação do ambiente e a destruição dos ecossistemas marinhos
- → Rápido crescimento do turismo marítimo.
- → A expansão da aquicultura
- → Interesse crescente e a utilização dos recursos energéticos, genéticos e minerais existentes nos fundos marinhos

Figura 1. Principais fatores de importância para a mudança de mentalidade com relação aos oceanos e seu modelo exploratório.

Sobrepesca é o termo utilizado para caracterizar a captura pesqueira acima do rendimento máximo sustentável. A sobrepesca inclui três tipos: sobrepesca de crescimento; sobrepesca de recrutamento e sobrepesca do ecossistema (Paully, 1994). Na maioria dos países, principalmente naqueles desenvolvidos, a sobrepesca é resultado de três fatores: aumento do número de pescadores, aparelhos de pesca mais eficientes e mecanização dos barcos. Deve-se ressaltar que os dois últimos fatores mencionados acima, foram muitas vezes encorajados, facilitados e financiados pelos próprios países, através da prática de subsídios, conforme mencionado no tópico exploração pesqueira, particularmente entre os anos 60 e 70.

Os primeiros indícios de sobreexploração pesqueira datam de meados do século XX, dando inicio à aplicação de modelos analíticos em biologia pesqueira que repercute no ordenamento e manejo pesqueiro (Gasalla & Soares, 2001). Tudo isso esteve vinculado, ou foi uma evolução de um dos

trabalhos científicos mais consagrados pela biologia pesqueira, os estudos de Volterra (1928), o qual enfocava as interações entre os estoques pesqueiros e o esforço de pesca.

O cenário atual de sobreexploração e o risco de extinção de muitas espécies de peixes e de crustáceos marinhos, juntamente com o declínio da produção mundial, têm impulsionado o homem na busca de outras alternativas para suprir a demanda de pescado. A aquicultura tem se mostrado uma atividade bastante promissora e em expansão, e vem alcançando uma taxa de crescimento anual de mais de 8% desde 1981. Este crescimento é bastante elevado em comparação a outras atividades agrícolas, como por exemplo, a pesca e a agricultura, que alcançaram um índice máximo de crescimento de 3% ao ano (Rana, 1997; Kristofersson & Anderson, 2006). Outro fator importante é que a aquicultura é uma atividade que apresenta elevada produtividade por hectare (entre 2.500 e 60.000 kg/ha/ano), utilizando menos superfície de terra, em comparação com outras atividades, como a pecuária, que produz uma média de 70 a 300 kg/ha/ano (FAO, 2006).

A redução da captura de pescado, aliado ao potencial de desenvolvimento da piscicultura no Brasil e no mundo, vem indicando o cultivo de peixes como excelente alternativa para a produção animal (Zaniboni Filho, 1997; Poly et al., 2004). Além disso, é sabido, que a carne de peixes possui alta qualidade para a saúde humana, sendo indicada pelas organizações de saúde em todo o mundo como o tipo de alimento mais adequado considerando-se os aspectos da vida moderna (FAO, 2006; 2009; Resende et al., 2009), o que proporciona mais um ponto positivo para o desenvolvimento da aquicultura, e em particular da piscicultura.

O crescimento da população mundial faz com que a demanda de alimento seja maior a cada ano, pressionando os setores básicos de produção a incrementarem suas produtividades e ampliar as áreas de atuação. O potencial de produção dos oceanos, mares, lagos e rios tem sido descrito por vários pesquisadores como o celeiro mundial, com múltiplas alternativas para o suprimento alimentar da população. Neste contexto, a aquicultura vem se desenvolvendo rapidamente em vários países, se tornando o novo foco da exploração dos recursos aquáticos, devido a sua capacidade de produzir alimento saudável e nutritivamente rico (Zaniboni Filho, 1997; Queiroz et al., 2002; Hannesson, 2003; FAO, 2006; Subasinghe et al., 2009), consolidado assim, o potencial que é dela esperado como o quarto sistema de produção de alimentos do mundo.

Evolução e papel da aquicultura

A aquicultura é o segmento de produção alimentícia de maior crescimento no mundo. Sua atividade vem crescendo sensivelmente em relação à pesca, tornando-se uma importante alternativa para a produção de pescado, tanto em área continental como marinha. Desde 1970, a contribuição da aquicultura para o fornecimento mundial de peixes, crustáceos, moluscos e outros organismos aquáticos continua crescendo, tendo aumentado de 3,9% da produção total em peso em 1970 para 27,1% em 2000; para 32,4% em 2004, e em 2006 alcançou o percentual de 36%. Este crescimento continua sendo mais rápido que o alcançado em qualquer

outro setor de produção de alimentos de origem animal (Vinatea, 2004; FAO, 2006; 2009).

Em todo o mundo, a taxa média de crescimento da aquicultura foi de 8,9% ao ano desde 1970, enquanto que, durante o mesmo período, a pesca de captura cresceu somente à razão de 1,2% e os sistemas de produção de carne em ambientes terrestres em torno de 2,8%. O aumento da produção da aquicultura foi muito superior ao crescimento demográfico, visto que, seu fornecimento médio anual *per capita* aumentou de 0,7 kg em 1970 a 7,8 kg em 2006, o que representa uma taxa de crescimento média anual de 6,9%. Estima-se que em breve a aquicultura supere a pesca de captura como fonte de pescado para a alimentação (Varadi, 2001; Camargo & Pouey, 2005; FAO, 2009).

Documentos da FAO (2006, 2009) apontam que a produção mundial da pesca e aquicultura forneceu em torno de 110 milhões de toneladas de pescado para consumo humano em 2006; deste total a aquicultura representou 47%, com uma produção declarada de 51,7 milhões de toneladas, a qual contabilizou um retorno financeiro da ordem de 65,3 bilhões de dólares. Este incremento de produção da aquicultura compensou de longe os efeitos do estancamento da produção da pesca de captura e do crescimento da população, proporcionando a mais de 2,6 milhões de pessoas pelo menos 20% do aporte médio necessário de proteínas animais.

Dados preliminares da pesca de captura mundial para 2007, baseadas nos informes de alguns dos principais países pesqueiros, indicam que a produção de pesca mundial alcançará quase 146 milhões de toneladas. Embora a quantidade total de pescado para o consumo humano chegue a este patamar, devido ao crescimento da população, o fornecimento global *per capita* se manteve aproximadamente no nível do ano de 2004; registrando-se uma diminuição no aporte da pesca de captura direcionada ao consumo humano, diminuição esta, compensada com o incremento produtivo da aquicultura (FAO, 2006, 2009). Desta forma, o cultivo surge como uma oportunidade para atendimento a essas necessidades.

A aquicultura mundial vem contribuindo com valores crescentes, com taxas superiores a 10% ao ano, tendo alcançado valores de 49 milhões de toneladas em 2001, gerando receitas da ordem de US$ 62 bilhões. Entretanto, essa produção é desigual no mundo. Os países asiáticos são os campeões. Na América Latina, o Chile é o principal produtor, com 694,7 mil toneladas, seguido pelo Brasil com 271,7 mil toneladas (Ibama, 2008; FAO, 2006; Resende et al., 2009).

Os dados mencionados acima ilustram bem o potencial e a importância da aquicultura. Em todo o mundo milhões de pessoas dependem direta ou indiretamente desta atividade para obter seus meios de subsistência. Durante as três últimas décadas, o número de pescadores e aquicultores cresceu mais rapidamente que a população mundial e os empregos no setor pesqueiro aumentaram com maior rapidez que o emprego na agricultura tradicional (Queiroz et al., 2002; Ibama, 2008). Em 2006, segundo estimativas da FAO (2009), 41 milhões de pessoas trabalhavam com dedicação completa ou parcial como pescadores e piscicultores, cifra que representava 3,1% do total de 1,360 bilhão de pessoas economicamente ativas no setor agrícola em todo o mundo, frente aos 2,3% observados em 1990, o que indica uma taxa de crescimento de 35%. Os notáveis incrementos registrados durante os últimos

dez anos, sobretudo na Ásia, refletem a grande expansão das atividades da aquicultura.

O potencial para a aquicultura evoluir e ter um papel preponderante na segurança alimentar mundial, é fato. Contudo, essa evolução deve ser pautada em três eixos: guia Holmenkollen para uma aquicultura sustentável; código de conduta para uma aquicultura responsável e boas práticas de manejo. Apesar dessa visão otimista da aquicultura, ela possui seus próprios problemas sociais e ambientais, suas vantagens e desvantagens (Figura 2).

Figura 2. Vantagens e desvantagens da aquicultura. Adaptado de Miller (2007).

Em alguns pontos, a aquicultura pode ser comparada à atividade humana de produção de energia. Atualmente está muito bem a produção de energia a partir de diversas fontes de combustíveis tais como: gás, óleo, urânio, etc., só que no passado, ninguém realmente considerou os problemas de poluição e degradação ambiental associados com o uso desses

combustíveis: aquecimento global, chuva ácida, mineração, derramamento de óleos, entre outros. Similarmente, os seres humanos têm investido considerável tempo e recursos no desenvolvimento de técnicas para criação de organismos aquáticos, com pouca atenção aos danos ambientais que podem causar ao ecossistema e a degradação localizada de habitats (Gesamp, 2001; Jennings, et al., 2001; Ellingsen et al., 2009).

Os efeitos ambientais nocivos da aquicultura podem limitar sua produção no futuro. Assim, reduzir o impacto ambiental desta prática tem sido um dos principias focos das pesquisas, que necessitam ser resolvido antes que mais expansões possam ocorrer na indústria da aquicultura.

Outro fator necessário para uma expansão sustentável da aquicultura, além de um melhor conhecimento das espécies nativas (Godinho, 2007), é um mapeamento das áreas ideais para serem utilizadas nos cultivos. Um pensamento equivocado, é pensar que a aquicultura sempre é uma atividade sustentável pelo fato de diminuir a pressão sobre os estoques pesqueiros. Se não houver um plano de desenvolvimento que contemple um mapeamento de áreas adequadas, com base em informações do meio físico e biótico, a aquicultura pode se tornar uma atividade impactante e ocasionar conflitos sociais por uso de recurso e espaço (Beltrame, 2003).

Entre os impactos negativos da atividade, complementando o que já foi exposto na Figura 1, pode-se citar: diminuição de habitat - que é um dos principais fatores que causam perda de biodiversidade no planeta; poluição dos recursos hídricos pelos efluentes gerados; desequilíbrio do ecossistema pela pesca de espécies de valor não comercial para formulação de rações; além da disseminação de doenças e perda de biodiversidade - competição e predação - com a introdução inadequada de espécies exóticas. De acordo com o Gesamp (2001), a falta de regulamentação específica para a atividade e o descumprimento da legislação ambiental são os principais promotores potenciais de impactos ambientais, não só para a aquicultura, mas também para as demais ações que promovam a extração ou mesmo o uso de um recurso natural.

Segundo a FAO (2006, 2009), de maneira geral, as tendências e perspectivas para a evolução da aquicultura global podem ser enumeradas em seis tópicos:

- ➔ Continuada intensificação da produção na aquicultura;
- ➔ Continuada diversificação do uso de espécies;
- ➔ Continuada diversificação dos sistemas de produção e práticas;
- ➔ Avanços para a melhor gestão do setor de aquicultura;
- ➔ Melhorar a regulação e a governabilidade do setor de aquicultura;
- ➔ Influência crescente de mercados, comércio e consumidores.

Potencial brasileiro da aquicultura

O Brasil, com mais de 8.5 milhões de quilômetros quadrados, tem uma das maiores reservas hídricas mundiais, com cerca de 12% da água doce disponível no planeta. A maior disponibilidade de corpos d'água situa-se nas regiões Norte e Centro Oeste, que concentram aproximadamente 89% do potencial de águas superficiais do país. (ANA, 2002; Diegues, 2006). Nessas regiões, no entanto, vivem somente 14,5% da população brasileira,

apresentando cerca de 9,2% da demanda hídrica nacional. Já os 11% restantes do potencial hídrico do Brasil encontram-se nas regiões Nordeste, Sul e Sudeste, onde se localizam 85,5% da população e 90,8% da demanda de água do Brasil (ANA, 2002). Dessa constatação resulta que, apesar do potencial de aquicultura de água doce ser muito grande na Região Norte, a reduzida população, aliada à falta de infraestrutura para comercio e transporte dos produtos aquicolas são obstáculos consideráveis à expansão dessa atividade na região. Além disso, nessa região existe uma pesca importante em água doce, com grande potencial de aumento dentro de um sistema adequado de manejo (Borghetti, 2002; Diegues, 2006).

Hoje a aquicultura é praticada em todos os Estados brasileiros e abrange, principalmente, as seguintes modalidades: piscicultura, carcinicultura, ranicultura e malacocultura. No Brasil, a aquicultura também vem despontando como atividade promissora, registrando um crescimento superior à média mundial, passando de 20,5 mil toneladas, em 1990, para 272 mil toneladas, em 2006, com uma receita de R$ 1,18 bilhões. No período de 1990-2006, o Brasil apresentou um crescimento de aproximadamente 825%, enquanto a aquicultura mundial cresceu 187% no mesmo período (Ibama, 2008). O resultado desse crescimento fica evidenciado na classificação mundial estabelecida pela FAO, em que o Brasil se encontrava na 36ª colocação em 1990, passando a ocupar a 17ª posição em 2006, assim como a 13ª posição na geração de renda bruta. No *ranking* da América do Sul, o Brasil encontra-se em segundo lugar, com 272 mil toneladas, sendo superado apenas pelo Chile com 694,7 mil toneladas (FAO, 2006; Ibama, 2008).

Na Amazônia, a aquicultura de água doce ainda é incipiente, mas existe um grande potencial tanto para o manejo da pesca quanto para a aquicultura nos inúmeros lagos de água doce, sobretudo naqueles em que existem acordos de pesca e manejo pesqueiro realizados entre o IBAMA e as comunidades ribeirinhas desses lagos (Diegues, 2006). A participação dessas comunidades na tomada de decisão, sobre o destino e uso dos recursos naturais, reveste-se de grande importância, à medida em que, atua como uma ferramenta de promoção do desenvolvimento e fomenta novas ações buscando agregar valor ao recurso explorado.

As possibilidades de utilização da aquicultura para o desenvolvimento social são muito promissoras. Existem diversas populações no mundo que são altamente dependentes do pescado para sobrevivência. A aquicultura é cada vez mais importante para essas populações, que vem enfrentando problemas com a escassez da pesca extrativista, pois, além de beneficiar as populações tradicionalmente envolvidas com o setor pesqueiro, tem sido utilizada também para o desenvolvimento de populações rurais.

No Brasil, a aquicultura tem participado cada vez mais do dia a dia de muitos trabalhadores rurais e pescadores artesanais. Uma de suas características marcantes é a estruturação em torno das pequenas propriedades, com exceção do setor dos camarões marinhos (Moreira et al., 2001; Diegues, 2006). Essa característica, se bem explorada, pode contribuir com a possibilidade de utilização da aquicultura para o desenvolvimento social. Através de programas específicos direcionados a populações carentes e apoiados pelo governo e pelas próprias comunidades, a aquicultura pode ser uma ferramenta muito útil de desenvolvimento sócio-econômico.

Um dos grandes desafios no emprego da aquicultura para o desenvolvimento de comunidades é a criação de mecanismos eficazes que assegurem, após a implantação dos projetos, sua autogestão e continuidade, permitindo que a comunidade seja capaz de se manter e continuar se desenvolvendo por conta própria (Coto, 2006; Diegues, 2006). O papel dos centros de pesquisa brasileiros é fundamental para o desenvolvimento da aquicultura nacional e, também, na busca de alternativas que beneficiem as populações de baixa renda. A atuação extensionista é muito importante, à medida em que atua na interface aquicultura e desenvolvimento social; orientando as comunidades na implantação de projetos desenvolvimentistas, sendo um canal para levar a tecnologia envolvida nos cultivos até as pessoas que estão fora dos centros de pesquisa.

A piscicultura no âmbito da aquicultura

Aproximadamente 300 espécies são cultivadas na aquicultura mundial, das quais 20% são espécies predadoras que rendem 10% de toda a produção em peso. Contudo, essas espécies tendem a ter maior valor comercial no mercado, representando ao redor de 40% do total do valor comercializado. Em contraste, peixes herbívoros e onívoros contribuem com aproximadamente 90% do peso da produção mundial, porém apresentam baixos preços de mercado (Jennings et al., 2001; FAO, 2006).

Os peixes formam o maior grupo componente da aquicultura mundial, tanto em termos de peso quanto em valor de mercado. Sua produção representa praticamente 53% da produção aquícola, sendo que entre os demais grupos temos moluscos, crustáceos, anfíbios, répteis e invertebrados aquáticos (Jennings et al., 2001). No âmbito mundial, a Ásia é responsável por cerca de 70% da produção total e o Brasil apresenta apenas 0,2% da produção (FAO, 2009). Em 2004 a Região Sul do Brasil era responsável por 32,7% da produção, seguida pelo Nordeste, com 21,6%, pelo Sudeste com 16,9% tendo o Norte uma participação inferior a 1% do total da aquicultura continental (Ibama, 2008).

Historicamente a piscicultura no Brasil é bastante antiga, sendo iniciada já com os primeiros colonizadores holandeses no estado de Pernambuco. Até a década de 70, o cultivo de peixes se caracterizou pelo cultivo extenso de espécies exóticas, normalmente sem fins lucrativos. A partir dos anos 80, algumas fazendas em regiões temperadas, particularmente na região serrana do interior de São Paulo, foram adaptadas ao cultivo intensivo de trutas, principalmente *Oncorhynchus mykiss* (Zaniboni Filho, 1997).

O cultivo de espécies nativas esteve limitado durante longo período pela falta de tecnologia de produção maciça de alevinos. Durante a década de 80, o desenvolvimento adequado de tecnologia de reprodução, larvicultura e alevinagem de espécies importantes para a piscicultura, como o tambaqui *Colossoma macropomum* e pacu *Piaractus mesopotamicus*, permitiu o desenvolvimento do cultivo de peixes em regiões tropicais, particularmente no mato Grosso e Região Norte do Brasil (Zaniboni Filho, 1997).

De acordo com informações levantadas pelo Ibama (2008) a piscicultura, na classificação nacional por produção, respondeu, em 2006, por uma produção estimada de 191.183,5 toneladas, correspondendo a aproximadamente 71% da produção da aquicultura brasileira.

As espécies mais frequentemente utilizadas na piscicultura brasileira, em ordem de importância, são: as carpas comuns e chinesas, as tilápias, os peixes redondos pacu e tambaqui e seus híbridos (tambacu). Porém, outras espécies, como os grandes bagres brasileiros (pintado, surubim, pirarara), o dourado e os *Brycon* (matrinxã, piracanjuba, piraputanga e piabanha), começam a despertar o interesse de criadores, não apenas por seu valor para a pesca esportiva, como também pela facilidade de comercialização.

A piscicultura mostra que os produtores têm-se preocupado, à exceção das tilápias, com novas espécies e não com o melhoramento daquelas já utilizadas em criações. Esta característica da atividade é comprovada pela utilização de mais de trinta diferentes espécies de peixes, com os mais variados hábitos alimentares e ambientes de vida, indo desde espécies de clima tropical (em sua grande maioria) até aquelas de climas temperado e frio. Essa diversificação tem acompanhado a transformação pela qual passa a piscicultura brasileira. Com a implementação de criações intensivas em reservatórios, através do uso de tanques-rede e gaiolas modificando o padrão então vigente de dez anos atrás, quando a piscicultura era praticada quase que exclusivamente em viveiros escavados e em pequenas represas.

De meados dos anos 90 para cá, a prática da criação em tanque-rede tem aumentado bastante, em razão, principalmente, dos baixos investimentos, se comparados aos da prática tradicional, decorrentes das facilidades de implantação e da disponibilidade de locais para sua instalação (Rotta & Queiroz, 2003). A exemplo dos setores avícola e bovino, a tendência de aproveitamento integral do pescado, faz com que o peixe possa ser inteiramente explorado, gerando diversos e novos produtos. Atualmente, a intensa busca do consumidor por maior praticidade requer que os produtos sejam de fácil manuseio, como filés e exemplares congelados individualmente, filés ou pedaços empanados congelados, *fishburguer*, croquetes, dentre outros. Além do desenvolvimento destes produtos com grande valor agregado, podem ser aproveitadas as aparas resultantes do processo de filetagem de peixes, para obtenção de carne mecanicamente separada.

Deve-se salientar as vantagens e benefícios gerados pelo aproveitamento de resíduos do processamento, evitando-se assim, o acúmulo de material gerador de problemas para o ambiente, que é o suporte de todo o cultivo, devido ao fato deste estar completamente dependente da utilização de água isenta de poluentes, para execução das suas atividades (Zaniboni Filho, 1997). Vale também ressaltar que os resíduos gerados na industrialização do pescado chegam a quase 60% do produto total industrializado.

A região norte do Brasil tem amplas condições de aproveitar esse potencial produtivo da piscicultura. Pois, a grande extensão da hidrobacia amazônica brasileira, aproximadamente 6.112.360 km^2, e a ampla diversidade ictiológica nela existente, estimada entre os patamares de 1.300 a 2.000 espécies, indicam que a piscicultura é o ramo da aquicultura que apresenta maiores potencialidades de utilização dos recursos pesqueiros, tanto do ponto de vista da sustentabilidade ecológica como nutricional e econômica (Fim, 1995).

Nos diversos Estados da região Norte do Brasil é cultivada uma variedade de espécies de peixes, crustáceos, quelônios e anfíbios. Entre os peixes, apenas 14 espécies nativas são cultivadas, o que em relação à diversidade de peixes da região, é um número extremamente reduzido. As principais espécies de peixes de água doce cultivadas são: tambaqui *C. macropomum*, curimatã *Prochilodus nigricans*, matrinxã *Brycon amazonicus* e pirarucu *Arapaima gigas*. Estimou-se que no Estado do Amapá, como em 86% da região Norte, a área média por aquicultor para o desenvolvimento de suas atividades, seja menor que 2 ha. Além disso, a criação em tanques-rede é incipiente e não aparece de forma significativa em nenhum dos Estados da região Norte (Val et al., 2000; Ibama, 2008).

As espécies nativas apresentaram um crescimento constante nos últimos anos, contribuindo com, aproximadamente, 30% da produção nacional, destacando-se o tambaqui *C. macropomum*, com 25.272 toneladas, o pacu *P. mesopotomicus* com cerca de 9.000 toneladas e o piau (*Leporinus* sp.) com 2.472 toneladas. O maior produtor de tambaqui é o estado do Amazonas, de pacu e piau é o estado Mato Grosso (Ostrensky et al., 2000; Ibama, 2008; Diegues, 2006). Essa produção anual de tambaqui e a produtividade apresentam uma grande variabilidade entre os diferentes estados da região Norte; o Amazonas apresenta uma produtividade de 4,45 t/ha, seguido por Rondônia, com uma produtividade de 3,49 t/há e o Amapá apresenta uma produtividade de 0,99 t/ha, estando apenas atrás do estado do Acre, com 0,64 t/ha (Ibama, 2008).

Este arranjo produtivo da piscicultura, na região Norte, poderá ser modificado dentro de alguns anos. Para isso, os projetos para criação de peixes necessitam ter um bom embasamento técnico-científico e acima de tudo um excelente planejamento do que se pretende cultivar, onde cultivar, como se vai cultivar e onde será comercializada a produção. O que se observa hoje em alguns locais desta região, é que muitos projetos de piscicultura carecem de um planejamento e estes são feitos por tentativa e erro, e quando assim se procede, a probabilidade de fracasso neste tipo de empreendimento é sempre maior.

Wilcox (2009) faz uma piada interessante em seu artigo sobre este assunto. Ele pergunta: “Como fazer uma pequena fortuna na piscicultura?”. Ao que, ele mesmo responde, em tom irônico: “Você deve começar com uma pequena fortuna”. É fato! E ele continua! A piscicultura é um agronegócio restrito. Cometa um erro e sua produção certamente morrerá; cometa um erro diferente e a fiscalização ambiental entrará o seu negócio; cometa ainda um outro erro, e as autoridades podem confiscar seus equipamentos, revogar sua licença, ou ainda executá-lo legalmente na justiça e confiscar toda sua produção. Este não é um negocio para a desorganização e despreparo. A piscicultura não vai lhe proporcionar fortuna de uma hora para outra. Todos os que conseguiram ficar ricos, o fizeram através de um trabalho árduo, longas horas de dedicação, com um investimento significativo, e de grande sacrifício pessoal (Wilcox, 2009). A Figura 3 traz uma adaptação do artigo de Wilcox (2009), e traz os 11 passos que o piscicultor não deve seguir. Assim, caso o piscicultor tenha estes passos em mente, com certeza reduzirá o risco do fracasso de seu investimento.

Aquicultura

Como fazer uma pequena fortuna na piscicultura?

➔ **Iniciar seu negócio sem um planejamento -** Falhar no planejamento é fatal: é como planejar o fracasso. Siga rigorosamente o planejado. Revisar seu planejamento é fundamental para o sucesso do empreendimento. Se você não sabe para onde está indo, então não vá.
➔ **Iniciar seu negócio sem dinheiro suficiente -** A causa número um do fracasso dos cultivos é o pouco capital. Esteja preparado para despesas e perdas não esperadas. Se os alevinos morrem terá que repô-los. Se o preço da ração aumenta, mesmo assim terá que adquiri-la. Se o aerador quebra deve consertá-lo rapidamente. Por fim, se você não tem capital para superar os imprevistos, não entre nesse negócio.
➔ **Emprestar dinheiro de seus parentes e amigos -** Seus parentes podem querer lhe emprestar dinheiro, mas o não pagamento poderá deixá-los irritados. Empreste de amigos apenas se você não os quiser mais como amigos. Evite usar a sua casa como garantia do empréstimo, você ainda necessitará de uma casa para morar se seu cultivo fracassar.
➔ **Escolher a espécie a ser produzida antes de fazer uma pesquisa de mercado -** Muitos produtores decidem que espécie produzir antes de saber se, ou como, podem ganhar dinheiro com ela. Das espécies aptas a tolerar seu sistema de cultivo e clima, selecione as mais rentáveis e destas, as que têm compradores no preço esperado. Se você cultivar a espécie errada, poderá perder até a camisa.
➔ **Decidir que espécie produzir antes de conhecer sua biologia -** Mesmo a espécie mais apreciada pelo mercado pode ser impossível ou muito cara para produzir. Após sua pesquisa de mercado avalie se a espécie escolhida é compatível com sua capacidade ou seu sistema de cultivo. Conheça a sua biologia geral, ecologia, doenças, parasitos e especialmente a biologia reprodutiva, antes de qualquer decisão.Espécies que não foram bem sucedidas em sua região, falharam por alguma razão.
➔ **Gastar seu dinheiro com "tecnologias do futuro" -** Se um sistema lhe parece muito bom para ser verdadeiro, cuidado! Muitos "sistemas de produção altamente produtivos" estão a venda. Peça para visitar um sistema que esteja funcionando bem por cinco anos e ver seus documentos de lucros e perdas declarados à receita federal, antes de decidir.
➔ **Escavar seus tanque e depois correr atrás da licença -** Há regras restritivas para a atividade da piscicultura comercial, drenagem, represamento, uso de várzeas, armazenagem e escoamento de água, etc. Se você escavar seus tanques antes de revisar as regras, estará sujeito a multas, poderá ter que intorremper suas atividades, ou ser obrigado a realizar um monitoramento muito caro.
➔ **Estocar seus tanques com altas densidades durante os primeiros anos -** Baixas densidades de estocagem podem significar menor lucro, mas certamente significam menores riscos. Melhor conseguir uma lucratividade de 75% da máxima por alguns anos, que perder tudo enquanto você aprende com tentativas e erros. Certamente você cometerá alguns erros sérios. Torne-os tão baratos quanto possível.
➔ **Produzir o peixe e então tentar vendê-lo -** A produção é apenas uma parte de seu negócio. Preços variam durante o ano. Assim, parte de seu planejamento deve ser dirigido para que sua despesca ocorra na época em que os preços estão no seu valor mais alto.
➔ **Não fazer parte de associações de aquicultores -** Nas reuniões e discussões você pode ter oportunidades de aprender com os erros de outros produtores, ao invés de ter que aprender com os seus erros.
➔ **Não ter contato com instituições de pesquisa e extensão -** Elas podem lhe fornecer literatura sobre as espécies, sistemas de produção, manejo, qualidade de água e outras tecnologias, bem como lhe proporcionar assessoria técnica e apoio continuado.

Figura 3. Onze passos do que não fazer para que seu empreendimento de piscicultura tenha sucesso. Adaptado de Jeffery Wilcox (2009).

Considerações finais

Com base nos estudos das populações de peixes, alguns estoques de espécies esgotadas poderiam ser recuperados se houver um controle cuidadoso. Isso envolve o estabelecimento de cotas de pesca, restrição ao uso de determinados equipamentos ou métodos de captura, fechamento de áreas de pesca durante os períodos de desova, interrupção do uso de redes, e reservas protegidas. Entretanto, a implementação de tais estratégias tem um altíssimo custo e com frequência não é popular do ponto de vista político.

O foco dos subsídios governamentais deveria passar a ser programas para resgatar alguns barcos pesqueiros e treinar suas tripulações para outras ocupações. Provocando assim a mudança ou diversificação de modelos exploratórios, que poderiam contribuir para a redução do número de embarcações no mar e consequentemente a recuperação de alguns estoques pesqueiros.

Dentre outros fatores, o melhoramento genético também é a chave para o desenvolvimento da piscicultura com espécies nativas do Brasil, como o tambaqui, o pacu, o pintado, o pirarucu, dentre outras. Melhoramentos genéticos dirigidos, realizados em peixes, têm mostrado um potencial médio de ganho na taxa de crescimento de 15% por geração.

Como a aquicultura é diretamente dependente do ecossistema em que se insere o cultivo, para o seu sucesso é necessário manter-se uma boa qualidade ambiental, o que requer boas práticas de manejo, técnicas apropriadas de cultivo e um constante monitoramento do ambiente. Se uma maior atenção for dada para todos estes fatores, certamente ocorrerá um desenvolvimento equilibrado do setor.

Documentos como o Guia Holmenkollen para uma Aquicultura Sustentável, formulado durante o Segundo Simpósio Internacional sobre Aquicultura Sustentável, e como o Código de Conduta para uma aquicultura responsável, elaborado pela FAO, podem ser utilizados como ferramentas para que se garanta a contínua satisfação das necessidades humanas nas gerações presentes e futuras, aliada ao desenvolvimento da aquicultura.

As estimativas mostram que com a tecnologia disponível no País associada às condições já mencionadas, a produção de peixes e camarões no Brasil pode chegar a mais de 1 milhão de toneladas. Caso isso aconteça, alguns fatores devem ser avaliados. A produção de rações, que no ano 2004 foi estimada em 304 mil toneladas, deverá chegar a mais de 2 milhões de toneladas. Este aumento resultaria em ampliação do número de fábricas, maior consumo de matérias-primas e, em especial, de farinha de peixe, ingrediente fundamental na fabricação de rações para organismos aquáticos, as quais, em parte, são importadas de outros países, e fomentam uma sobrepesca de espécies não comerciais para que a matéria prima esteja sempre disponível.

A aquicultura tem espaço para se desenvolver, desde que utilize as melhores técnicas e seja ambientalmente sustentável. A piscicultura em tanque-rede será um dos grandes produtores de peixes no futuro. As criações em viveiros escavados também apresentaram grande crescimento, mas nada que se compare ao aumento daqueles em tanque-rede.

O conhecimento sobre o impacto ecológico das atividades de aquicultura é limitado, 56 anos de dados empíricos, desde a consolidação da ciência ecologia, podem não ser suficientes para predizer o futuro, e com as mudanças ambientais (clima, solos, e outros), espécies que eram de baixo risco podem-se se tornar de alto risco ambiental. Portanto, devemos estar atentos que seremos obrigados a fornecer soluções e consultoria para o desenvolvimento robusto da avaliação dos riscos da aquicultura no ambiente, e definir políticas para o futuro, que será responsável pela limitação futura de introdução de espécies exóticas na aquicultura.

Um dos grandes desafios no uso da aquicultura para o desenvolvimento de comunidades, é a criação de mecanismos eficazes que assegurem após a implantação dos projetos sua autogestão e continuidade, permitindo que a comunidade seja capaz de se manter e continuar se desenvolvendo por conta própria, principalmente na Amazônia. O papel dos centros de pesquisa brasileiros é fundamental para o desenvolvimento da aquicultura nacional e, também, na busca de alternativas que beneficiem as populações de baixa renda. A atuação extensionista é de extrema relevância, à medida em que atua na interface aquicultura e desenvolvimento social, orientando as comunidades na implantação de projetos desenvolvimentistas, sendo um canal para se levar a tecnologia envolvida nos cultivos até as pessoas que estão fora dos centros de pesquisa.

Referências

ANA - AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS. 2002. *Avaliação das Águas do Brasil*. Brasília:Ministério do Meio Ambiente.

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. 2007. *Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil*. Maringá: Eduem.

ALVERSON, D. L.; FREEBERG, M. H.; POPE, J. G.; MURAWSKI, S. A. 1994. A global assessment of fisheries bycatch and discards. Roma: FAO, Fisheries Technical Paper 339.

ASCHE, F.; TVETERAS, S. 2004. On the relationship between aquaculture and reduction fisheries. *J. Agric. Econ.,* 55(2):245-265.

BELTRAME, E. 2003. *Seleção de sítios e planejamento da atividade de cultivo de camarões marinhos com base em geotecnologias.* 197f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BLABER, S. J. M. 2000. *Tropical estuarine fishes: ecology, exploitation and conservation*. London: Blackweel Science.

BLABER, S. J. M; CYRUS, D. P.; ALBARET, J. J.; CHING, C. V.; DAY, J. W.; ELLIOTT, M.; FONSECA, M. S.; HOSS, D. E.; ORENSANZ, J.; POTTER, I. C.; SILVERT, W. 2000. Effects of fishing on the structure and functioning of estuarine and nearshore ecosystems. *ICES J. Marine Sc.*, 57:590-602.

BORGHETTI, J. R. 2002. Estimativa da pesca e aquicultura de água doce e marinha. In: CONFERÊNCIAS SELECIONADAS NA VI REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO DE PESCA. Série Relatórios Técnicos, 3, São Paulo.

CAMARGO, S. G. O.; POUEY, J. L. O. F. 2005. Aquicultura - um mercado em expansão. *Rev. Bras. Agroc.*, 11(4):393-396.

CARPENTER, S. R.; TURNER, M. 2000. Opening the black boxes: Ecosystem science and economic valuation. *Ecosystems*, 3:1-3.

COTO, M. C. 2006. Aquicultura familiar em Cuba. *Rev. Agricult. Urbana*, Nº 14.

DIEGUES, A. C. 2006. Para uma aquicultura sustentável do Brasil. São Paulo: NUPAUB. Artigos Nº 3. 26p.

ELLINGSEN, H.; OLAUSSEN, J. O.; UTNE, I. B. 2009. Environmental analysis of the Norwegian fishery and aquaculture industry – A preliminary study focusing on farmed salmon. *Marine Pol.*, 33:479-488.

FAO – FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. 2006. State of world aquaculture 2006. Roma: FAO, Fisheries Technical Paper 500

FAO – FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. 2009. The state of world fisheries and aquaculture 2008. Roma: FAO.

FIM, J. D. I. 1995. Sistema integrado de cultivo entre animais e peixes. In: VAL, A.L.; HONCZARYK, A. *Criando peixes na Amazônia.* Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 149p.

GASALLA, M. A.; SOARES, L. S. H. 2001. Comentários sobre os estudos tróficos de peixes marinhos no processo histórico da ciência pesqueira e modelagem ecológica. *B. Inst. Pesca*, 27(2):247-263.

GESAMP. 2001. (IMO/FAO/UNESCO-IOC/WMO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environnmental Protection). Planing and management for sustenible coastal aquaculture development. Rep. Stud. Gesamp (68), 90p.

GODINHO, H. P. 2007. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Rev Bras Reprod Anim*., 31(3):351-360.

HANNESSON, R. 2003. Aquaculture and fisheries. *Marine Pol.*, 27:169-178.

IBAMA – INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. 2008. *Estatística da Pesca 2006 Brasil: grandes regiões e unidades da federação*. Brasilia,DF. 174p.

HORSTEN, M. B.; KIRKEGAARD, E. 2003. Bycatch from a perspective of sustainable use. *IUCN SSC European Sustainable Use Specialist Group: Fisheries Working Group*, p. 1-16.

JENNINGS, S.; KAISER, M. J.; REYNOLDS, J. D. 2001. *Marine fisheries ecology*. United Kingdom: Blackwell Science, 417p.

KRISTOFERSSON, D.; ANDERSON, J. L. 2006. Is there a relationship between fisheries and farming? Interdependence of fisheries, animal production and aquaculture. *Marine Pol.*, 30:721-725.

KRÜGER, E. L. 2001. Uma abordagem sistêmica da atual crise ambiental. *Desenvolv. Meio Amb.*, 4: 37-43.

MILLER, G. T. 2007. *Ciência Ambiental*. Tradução da 11ed. Norte-americana. São Paulo: Thomson.

MOREIRA, H. L. M; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; ZIMMERMANN, S. 2001. *Fundamentos da Moderna Aquicultura*. Canoas: Ed. Ulbra, 200p.

NAYLOR, R. L; GOLDBURG, R. J.; PRIMAVERA, J. H.; KAUTSKY, N.; BEVERIDGE, M. C. M.; CLAY, J.; FOLKE, C.; LUBCHENCO, J.; MOONEY, H.; TROELL, M. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405:1017-1024.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; PEDINI, M. 2000. Situação atual da aquicultura brasileira e mundial. In: VALENTI, W. C.; POLI, C. R.; PEREIRA, J. A.; BORGHETTI, J. R. (Ed.). *Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável*. Brasília: Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq/Ministério da Ciência e Tecnologia, 399p.

PAIVA, M. P. 1996. Recursos Pesqueiros. In: MMA. *Levantamento do estado da arte da pesquisa dos recursos vivos marinhos do Brasil*. Brasília: Secretaria de Coordenação dos Assuntos do Meio Ambiente – SMA, Programa REVIZEE.

PAULY, D. 1994. *On the sex of fish and the gender of scientist*. London. Chapman & Hall.

PAULY, D. 2002. Fisheries management. Nature Publishing Group, Encyclopedia of life sciences, p. 1-5.

PAULY, D.; ALDER, J.; BENNETT, E.; CHRISTENSEN, V.; TYEDMERS, P.; WATSON, R. 2003. The future for fisheries. *Science*. 302:1359-1361.

PHILIPPART, C. J. M. 1998. Long-term impacto f bottom fisheries on several by-catch species of demersal fish and benthic invertebrates in the south-eastern North Sea. *ICES J. Marine Sc.*, 55:342-352.

POLI, C. R.; POLI, A. T. B.; ANDREATTA, E.; BELTRAME, E. 2004. *Aquicultura: Experiências Brasileiras. Florianópolis*. Multitarefa Editora.

QUEIROZ, J. F.; LOURENÇO, J. N. P.; KITAMURA, P. C. 2002. *A Embrapa e a aquicultura: demandas e prioridades de pesquisa.* Brasília: Embrapa: Informação Tecnológica.

RANA, K. 1997. Recent Trends in global aquaculture production: 1984-1995. *FAO Aquaculture Newsletter,* 16:14-19.

RESENDE, E. K.; RIBEIRO, R. P.; LEGAT, A. P.; BENITES, C. 2009. Melhoramento genético em peixes – uma revolução na aquicultura do Brasil. *Boletim SBI*, 94:5-6.

ROTTA, M. A.; QUEIROZ, J. F. 2003. Boas práticas de manejo (BPMs) para a produção de peixes em tanques-redes. Corumbá: Embrapa Pantanal. Série Documentos, 47.

SUBASINGHE, R.; SOTO, D.; JIA, J. 2009. Global aquaculture and its role in sustainable development. *Reviews in* Aquaculture. 1:2-9.

SWINTON, S. M. 2005. As ecosystem services are demanded of agriculture, what of agricultural economists? *Western Economics Forum*.

VARADI, L. 2001. Review of trends in the development of European inland aquaculture linkages with fisheries. *Fish. Manag. Ecol.*, 8:453-462.

VINATEA, L. A. 2004. *Fundamentos de Aquicultura*. Florianópolis: Editora da UFSC.

VOLTERRA, V. 1928. Variations and fluctuations of the number of individuals in animal species living together. *J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer*., 3:1-51.

WALDIGE, V.; CASEIRO, A. 2004. A indústria de rações: situação atual e perspectivas. *Panorama Aquicul., 81*(14):27-32.

WILCOX, J. 2009. How to make a small fortune in aquaculture. Disponível em:http://www.aquaculturecouncilwa.com/how-to-get-into-aquaculture/ how- to-make-a-small-fortune-in-aquaculture.

ZANIBONI FILHO, E. 1997. O desenvolvimento da piscicultura brasileira sem a deterioração da qualidade de água. *Rev. Brasil. Biol.*, 57(1):3-9.

ZIMMERMANN, S. 2001. Estado atual e tendências da moderna aquicultura. In: MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; ZIMMERMANN, S. (Org.). *Fundamentos da moderna aquicultura*. Canoas: Editora da ULBRA, p. 191-199.

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 2

Criação comercial do tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)

Bruno Adan Sagratzki Cavero, Maria Anete Leite Rubim & Thiago Marinho Pereira

Resumo
A criação de tambaqui Colossoma macropomum vem crescendo em ritmo acelerado nos últimos anos, contribuindo consideravelmente no agronegócio no estado do Amazonas. Esta nova dinâmica tem incentivado a profissionalização desta atividade, levando ao surgimento de empreendimentos com perfil empresarial. Esta nova fase da criação do tambaqui demanda de informações econômicas mais precisas, associadas aos parâmetros de crescimento da espécie, que gerem políticas de fomento condizentes com a nova realidade. Este capítulo tem então o objetivo de contribuir com informações técnico-econômicas que possam nortear empreendimentos e as ações de linhas de crédito existentes, através das agências de fomento.

Abstract
In recent years, tambaqui Colossoma macropomum culture which has grown at a faster rate, is considerably contributing to agribusiness in the Amazonas state. This new dynamics has stimulated its professionalization and has led to the emergence of new enterprises with business profile. This new phase in tambaqui culture requires more accurate economic information linked to growth parameters that can result in promoting policies conducive to this new paradigm. This chapter is aimed at providing proper technical and economic information that can give a new direction both enterprises and credit flow through funding agencies.

Introdução

A piscicultura no estado do Amazonas é uma área do agronegócio que vem crescendo em ritmo acelerado nos últimos cinco anos. Este crescimento acompanha uma tendência mundial de profissionalização, o que já ocorre em outras atividades agropecuárias (Gonçalves, 2005; Iglécias, 2007).

Por deter grande porção do mercado regional destinado aos peixes, entre estes, o tambaqui *Colossoma macropomum* é o que merece maior destaque, devido sua adaptabilidade aos ambientes de cultivo (Arbeláez-Rojas et al., 2002). Além disso, a consolidação da atividade é favorecida pela tecnologia de propagação artificial e cadeia produtiva estabelecida (Parente et al., 2003; Nunes et al., 2006).

A piscicultura desta espécie despertou o interesse empresarial devido à rentabilidade, pois, pode alcançar Taxa Interna de Retorno (TIR) acima de 40% por safra de comercialização e Período de Recuperação do Capital (PRC) abaixo de três anos (Izel & Melo, 2004).

Para o cultivo de tambaqui diversas estratégias estão sendo desenvolvidas com o intuito de aumentar a produtividade. Sistema de aeradores e/ou similares (Boyd, 1998; Sipaúba-Tavares et al., 1999), privação alimentar (Ituassú et al., 2004), utilização de enzimas exógenas (Nunes et al., 2006) e dimensionamento de viveiros (tamanho e profundidade) são exemplos tecnológicos que já demonstraram capacidade de incremento na produtividade desta espécie, diminuindo os custos de produção.

Alevinagem

É realizada em pequenos viveiros onde se espera que os peixes atinjam tamanho suficiente para ir para os viveiros de engorda. O tamanho final para os peixes nesta fase depende da programação do ciclo de produção do empreendimento.

Os alevinos geralmente são estocados com tamanhos de 2 a 3 cm e peso médio de 1,5 a 2 g. É possível calcular a biomassa final esperada após a recria como, por exemplo, no viveiro descrito acima são estocados 12.000 alevinos de tambaqui, aos 45 dias espera-se um crescimento que proporcione um peso final de 80 g. Essa relação final permitirá calcular a biomassa final que o viveiro, em condições ótimas, irá suportar, que será de 1.000 kg, ou seja, 12.000 alevinos de 80 g de peso médio (Tabela 1), a biomassa será atingida aos 45 dias (Figura 1).

Na Figura 1, pode ser observado que a biomassa máxima (1.000 kg) do viveiro em questão será atingida em 45 dias. Se tratando de viveiros com dimensões diferentes, recomenda-se refazer os cálculos de produtividade, com a finalidade de evitar transtornos durante a recria.

Tabela 1. Descrição de produtividade de um viveiro de alevinagem de 2.000 m^2 e 1,0 m de profundidade com relação ao consumo de oxigênio do viveiro.

Superfície (m^2)	Profund. (m)	Volume (m^3)	Conversão p/litros	OD (mg/L)	Total OD disponível	Consumo do tanque (% do total)	OD disponível para os peixes	Consumo dos peixes mgOD/kg de biomassa/hora	Período (horas)	Capac. viveiro (kg)
2.000,00	1,00	2.000,00	2.000.000,00	5,00	10.000.000,00	70,00	3.000.000,00	250	12	1.000,00
2.000,00	1,00	2.000,00	2.000.000,00	5,00	10.000.000,00	71,00	2.900.000,00	250	12	966,67
2.000,00	1,00	2.000,00	2.000.000,00	5,00	10.000.000,00	72,00	2.800.000,00	250	12	933,33
2.000,00	1,00	2.000,00	2.000.000,00	5,00	10.000.000,00	73,00	2.700.000,00	250	12	900,00
2.000,00	1,00	2.000,00	2.000.000,00	5,00	10.000.000,00	74,00	2.600.000,00	250	12	866,67
2.000,00	1,00	2.000,00	2.000.000,00	5,00	10.000.000,00	75,00	2.500.000,00	250	12	833,33
2.000,00	1,00	2.000,00	2.000.000,00	5,00	10.000.000,00	76,00	2.400.000,00	250	12	800,00
2.000,00	1,00	2.000,00	2.000.000,00	5,00	10.000.000,00	77,00	2.300.000,00	250	12	766,67
2.000,00	1,00	2.000,00	2.000.000,00	5,00	10.000.000,00	78,00	2.200.000,00	250	12	733,33
2.000,00	1,00	2.000,00	2.000.000,00	5,00	10.000.000,00	79,00	2.100.000,00	250	12	700,00
2.000,00	1,00	2.000,00	2.000.000,00	5,00	10.000.000,00	80,00	2.000.000,00	250	12	666,67

OD: Oxigênio dissolvido; Profund.:Profundidade; Capac. viveiro: Capacidade do viveiro.
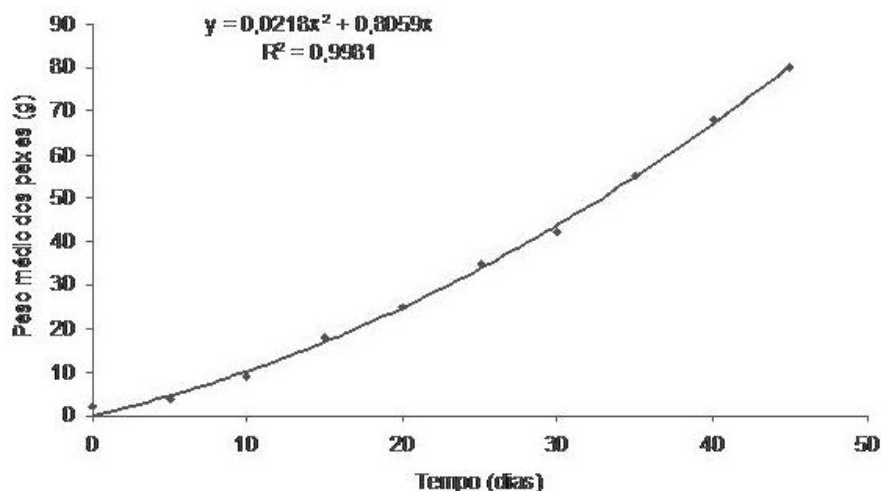
Figura 1. Perfil de crescimento em peso de juvenis de tambaqui (n=12.000) cultivados em viveiros com fundo de argila (2.000m^2) durante 45 dias.

A - Preparação de viveiros e qualidade da água

A qualidade da água é um item imprescindível para a criação de peixes em qualquer fase de crescimento (Boyd, 1982; Sipaúba-Tavares, 1994; Pereira & Mercante, 2005). Durante a recria, quando o adensamento é grande e os peixes possuem uma maior taxa de respiração por unidade de biomassa/tempo, este cuidado deve ser maior.

Para a criação comercial de peixes em viveiros com fundo de argila é necessário realizar a aplicação de calcário (correção do pH do solo) e adubo químico (facilitar a produtividade primária), incentivando a proliferação de micro-organismos fotossintéticos e plânctons em geral (Garg & Bhatnagar, 2000). As quantidades de calcário e adubo podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2. Aplicação de calcário e adubação em viveiros de recria para juvenis de tambaqui*.

Itens	kg/ha	kg/m^2
Calcário*	2.000	400
Superfosfato triplo*	200	40
Uréia ou Sulfato de amônio*	300	60

* Dados fornecidos pela Agroindustrial Tambaqui Ltda.

Esta quantidade de adubo é suficiente para manter as condições da água com qualidade adequada para a recria. A aplicação deverá ser realizada em duas fases. No momento de enchimento do viveiro deverão ser aplicados 100% do calcário e 60% da adubação. Na segunda fase, após 20 dias, será realizada apenas a aplicação do adubo restante (Agroindustrial Tambaqui, 2008). As variáveis físicas e químicas apresentadas na Tabela 3 deverão permanecer estáveis e com as variações projetadas para a recria nestas condições.

É recomendável estabelecer a biomassa máxima a ser estocada no viveiro, uma vez que o excesso de densidade de estocagem leva a maior heterogeneidade do lote a ser criado, prejudicando o processo de engorda. A piscicultura moderna tem por finalidade produzir lotes mais homogêneos possíveis, uma vez que esta prática facilita a negociação e comercialização do peixe.

Tabela 3. Valores médios ± desvio padrão dos parâmetros da qualidade da água, desejáveis para a recria de juvenis de tambaqui.

Parâmetro observado	Variação
pH	6,0 ± 1,0
Temperatura (ºC)	26,7 ± 0,4
Condutividade elétrica (μS/cm2)	~ 40,0 ± 5,0
Oxigênio dissolvido (mg/L)	5,5 ± 1,0
Amônia total (NH3 + NH4) (mg/L)	Abaixo de 0,5 ± 0,01
Amônia não ionizada (NH_3) (mg/L)	Abaixo de 0,5 ± 0,01
Nitrito (mg/L)	Abaixo de 0,01 ± 0,001
Transparência (cm de profundidade)*	40 cm ± 10,0
Gás carbônico (mg/L)	Até 10,0
Dureza (mg de $CaCO_3$/L)	40-120

* Medição realizada com o disco de Secchi.

B - Oferta de alimento

Durante os primeiros quinze dias o alimento deve ser ofertado quatro vezes ao dia, na proporção de 10% da biomassa de peixe estocada. Após este período, a alimentação deve ser realizada duas vezes ao dia na proporção de 5% de biomassa estocada até completar os quarenta e cinco dias de recria.

C - Investimento, custos e rentabilidade

Na Tabela 4 é possível observar o valor do investimento e os custos de produção de juvenis de tambaqui (n = 12.000) em viveiros com fundo de argila de 2.000 m^2. O preço de produção por indivíduo é de R$0,55 (cinqüenta e cinco centavos de real). Entretanto o custo de produção por quilograma é de R$ 6,83 (seis reais e oitenta e três centavos). O valor de venda de juvenis de 0,08 kg pode chegar a R$ 1,50 (um real e cinqüenta centavos) por indivíduo.

Tabela 4. Custos da recria de juvenis de tambaqui (n = 12.000) em viveiros com fundo de argila de 2.000 m^2.

Investimento						
Capital	Serviços/Descriminação	Unidade	Quant.	Preço Unitário	Depreciação (anos)	Total
Limpeza da área	Remoção da camada orgânica e destocamento (deslocamento, elevação, carga, trasporte e espalhamento)	m^2	0,3	R$ 3.000,00	20,00	R$ 45,00
Viveiro semi-escavado	Escavação, carga, transporte, espalhamento e compactação	m^3	1012	R$ 12,00	20,00	R$ 607,20
Balança		Unidade	1	R$ 720,00	5,00	R$ 144,00
Redes p/Despesca		Unidade	2	R$ 1.500,00	3,00	R$ 1.000,00
Projeto		Unidade	1	R$ 560,00	20,00	R$ 560,00
Mão de Obra		Unidade	1,5	R$ 415,00		R$ 622,50
Encargos trabalhistas		Unidade	1,5	R$ 373,50		R$ 560,25
Energia elétrica		kW/h	60	R$ 0,27		R$ 16,20
Custeio						
Animais	Juvenis	milheiro	12	R$ 100,00		R$ 1.200,00
Arraçoamento	Ração Inicial 34% PB	saco 25 kg	40	R$ 32,50		R$ 1.300,00
Adubação	Superfosfato Triplo	saco 50 kg	1	R$ 124,00		R$ 124,00
	Ureia	saco 50 kg	1	R$ 102,00		R$ 102,00
Calagem	Calcário Dolimítico	saco 40 kg	20	R$ 16,00		R$ 320,00

Custo total	R$ 6.556,15
Média de peso dos peixes (kg)	0,08
Biomassa final esperada (kg)	960,00
Custo/kg de peixe produzido	R$ 6,83
Custo/unidade	R$ 0,55

Nesta análise podemos perceber que o custo de produção para peixes de 0,08 kg é de R$ 6,83/kg produzido, ou custo unitário de R$ 0,55 por unidade de peixe. Esta avaliação cria a expectativa de usar a recria (alevinagem) como alternativa de negócio, para o fornecimento de juvenis avançados. Ainda, permite que produtores especializados apenas em engorda de peixes possam encurtar seus ciclos de produção em 45 dias, ou em 14%

do período. Na tabela abaixo, foram simuladas algumas situações comerciais de um empreendimento especializado na venda de juvenis avançados.

Tabela 5. Preço de venda (R$/milheiro), receita bruta, custos de produção e receita líquida na recria de juvenis de tambaqui (n = 12.000) em viveiros com fundo de argila de 2.000 m^2 e peso médio final de 0,08 kg.

Preço de venda (R$/milheiro)	Receita bruta (R$)	Custos de produção (R$)	Receita líquida (R$)
800,00	9.600,00	6.600,00	3.000,00
1000,00	12.000,00	6.600,00	5.400,00
1250,00	15.000,00	6.600,00	8.400,00
1500,00	18.000,00	6.600,00	11.400,00

A prática de venda de juvenis avançados é viável. Entretanto, apresenta o entrave do transporte. É necessário que produtores desta modalidade estejam preparados para enfrentar este problema, uma vez que, para transportar 1.000 juvenis de tambaqui de 0,08 kg (80 kg) serão necessários 1.000 litros de água com oxigenação constante (é aconselhável manter a concentração de OD em 6,0 mg/litro).

Não é recomendado transportar peixes grandes por períodos muito longos devido ao estresse e ao custo alto do frete. O período de transporte adequado não deve ultrapassar dez horas. Os dados da Tabela 6 mostram a relação do preço do frete com relação a distância do transporte.

Tabela 6. Valor do frete a ser praticado por quilômetro percorrido.

Distância do transporte (km)*	R$/km	Valor do Frete
100	R$ 12,84	R$ 1.284,00
200	R$ 6,98	R$ 1.396,00
300	R$ 5,03	R$ 1.509,00
400	R$ 4,05	R$ 1.620,00

*Incluídos os valores do retorno.

Engorda e índices zootécnicos

É realizada em viveiros e/ou reservatórios (barragens) de diversos tamanhos, onde se espera que os peixes atinjam tamanho suficiente para a

comercialização. O tamanho final para os peixes nesta fase depende da programação do ciclo de produção do empreendimento. Na Figura 2, podemos verificar o perfil de crescimento do tambaqui em viveiros escavados com fundo de argila destinados a engorda ao longo do cultivo.

Na Figura 2 é possível observar que para o tambaqui atingir um peso médio de 2 kg são necessários 315 dias (45 dias de recria e 270 dias de engorda). Os índices zootécnicos de produção podem ser observados na Tabela 6. A partir dessa informação é possível calcular a produtividade e consumo de ração de um empreendimento de criação de tambaqui.

Neste caso, o consumo de ração pode ser calculado pela relação existente entre a conversão alimentar alcançada e o ganho de peso. Por exemplo: para calcular o consumo de ração de uma biomassa de 10.000 kg de tambaqui é necessário relacioná-la à conversão alimentar, ou seja, 10.000 kg x 1,6 = 16.000 kg de ração. Como cada saco de ração possui um padrão de 25 kg, o cálculo pode ser realizado em quantidade de sacos consumidos: 16.000 kg/25 kg = 640 sacos. A partir desse resultado é possível consultar o preço do saco de ração e realizar o orçamento da ração a ser consumida (Tabela 8).
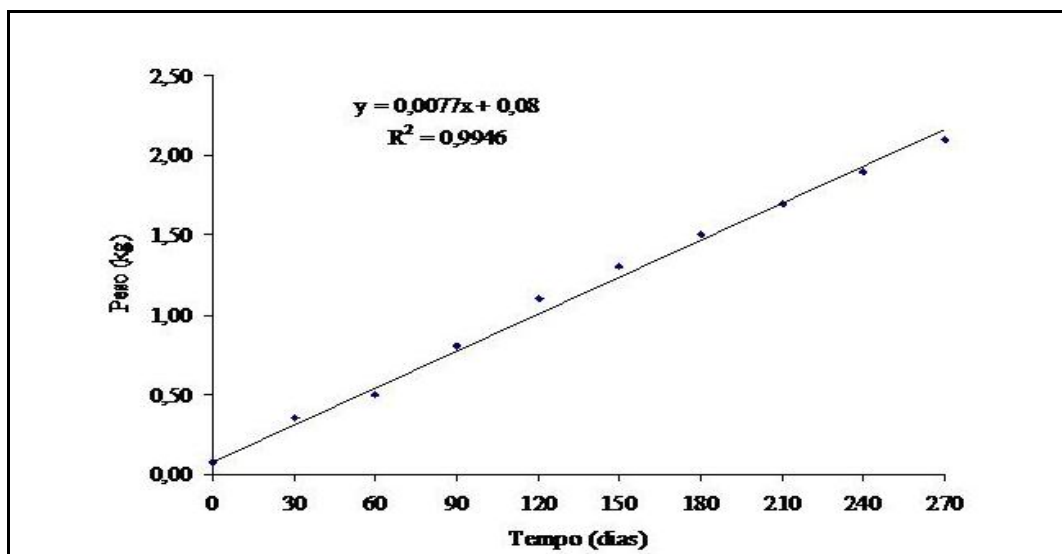
Figura 2. Perfil de crescimento do tambaqui (peso médio/g) em viveiros escavados com fundo de argila (área= 1,5 hectares), período de engorda de 270 dias, acrescido de 45 dias de recria.

Tabela 7. Médias do peso inicial, do peso final, do ganho de peso, da conversão alimentar aparente e da sobrevivência de juvenis de tambaqui cultivados em viveiros semiescavados durante 270 dias (*).

Variáveis	Níveis
Peso Inicial (g)	80,0 ± 9,4
Peso Final (g)	2016,7 ± 156,1
Ganho de Peso (g)	1936,7 ± 225,0
Conversão Alimentar Aparente	1,6 ± 0,3
Sobrevivência (%)	99,00

(*) Dados cedidos pela Agroindustrial Tambaqui Ltda.

A - Investimento, custos e rentabilidade

Na Tabela 8 é possível observar o valor do investimento e os custos de produção de juvenis de tambaqui (n = 20.000) em cinco (05) hectares de viveiros semiescavados com fundo de argila (módulo mínimo comercial para esta modalidade). O preço de produção por indivíduo foi de R$ 7,89 (sete reais e oitenta e nove centavos) (Tabela 10) e o custo por quilograma de peixe produzido foi de R$ 3,95 (três reais e noventa e cinco centavos). O valor de venda de juvenis de 2,00 kg praticado nas pisciculturas no entorno de Manaus, AM, pode chegar a R$ 6,00 (seis reais) por quilograma.

Alguns autores citam que a ração é o item mais caro do processo de produção, chegando a representar entre 60% a 80% dos custos totais de produção (Pereira-Filho, 1995). No levantamento realizado neste trabalho os custos com ração não ultrapassaram os 43% dos custos totais (Tabela 9). Provavelmente, os trabalhos anteriores não levaram em consideração o pagamento e/ou amortização do investimento ao longo do tempo. Este tipo de abordagem é muito comum e pode levar a subestimar os custos com investimento de capital e fixo ao instalar um empreendimento de piscicultura. Os custos com investimentos de capital e fixo devem ser levantados, uma vez que representam mais de 40% dos custos totais de produção.

Tabela 8. Investimento e custeio (criação de tambaqui) necessários para a instalação de cinco (05) hectares de lâmina d'água para viveiros semiescavados com fundo de argila. Neste levantamento foi considerado conversão alimentar de 1,6 e preço do saco de ração a vinte e seis reais e cinqüenta centavos (R$ 26,50).

CAPITAL	Serviços/ Descriminação	Unidade	Quant.	Preço Unitário	Depreciação (anos)	Total	Total(não depreciado)
Limpeza da área	Remoção da camada orgânica e destocamento (deslocamento, elevação, carga, transporte e espalhamento)	Ha.	7,00	R$ 3.000,00	10,00	R$ 2.100,00	R$ 21.000,00
Viveiro semi escavado	Escavação, carga, transporte, espalhamento e compactação	m^3	14.831,8	R$ 12,00	10,00	R$ 17.798,20	R$ 177.981,96
Reservatório de água	Escavação, carga, transporte, espalhamento e compactação	m^3	3.200,00	R$ 12,00	10,00	R$ 3.840,00	R$ 38.400,00
Sistema de bombeamento	Complexo motobomba (motor 67 CV/bomba tipo mancal 4"x6".	Vários	1,00	R$ 18.500,00	10,00	R$ 1.850,00	R$ 18.500,00
Sistema de abastecimento	Tubulação PVC com conexões (500 m)	Vários	1,00	R$ 6.041,66	10,00	R$ 604,17	R$ 6.041,66
Sistema de drenagem	Estrutura tipo cachimbo. Concreto, tubo PVC rígido (200mm)	Vários	5,00	R$ 1.350,00	10,00	R$ 675,00	R$ 6.750,00
Instalações elétricas	Rede elétrica aérea de alta tensão. Transformador 75 kva. Conexões	Vários	1,00	R$ 16.500,00	10,00	R$ 1.650,00	R$ 16.500,00
Balança		Unidade	1,00	R$ 3.250,00	5,00	R$ 650,00	R$ 3.250,00
Redes p/Despesca		Unidade	2,00	R$ 3.200,00	3,00	R$ 2.133,33	R$ 6.400,00
Projeto		Unidade	1,00	R$ 5.000,00	10,00	R$ 500,00	R$ 5.000,00
							R$ 299.823,62
CUSTO FIXO							
Mão-de-Obra		Unidade	36,00	R$ 415,00		R$ 14.940,00	
Encargos trabalhistas		Unidade	36,00	R$ 290,50		R$ 10.458,00	
Energia elétrica		kW/h	2.250,00	R$ 0,27		R$ 607,50	
Manutenção		Unidade	1,00	R$ 6.629,76		R$ 6.629,76	
CUSTEIO							
Animais	Juvenis	milheiro	20,00	R$ 550,00		R$ 11.000,00	
Arraçoamento	Ração Crescimento I 28% PB	Saco 25 kg	2.560,00	R$ 26,50		R$ 67.840,00	
Adubação	Superfosfato Triplo	Saco 50 kg	20,00	R$ 124,00		R$ 2.480,00	
	Uréia	Saco 50 kg	40,00	R$ 102,00		R$ 4.080,00	
Calagem	Calcário Dolomítico	Saco 40 kg	500,00	R$ 16,00		R$ 8.000,00	
				Custo total		R$ 157.835,96	

Tabela 9. Resumo do investimento e custeio para a criação de tambaqui em viveiros semiescavados com fundo de argila (CTP = custo total de produção).

		% do CTP
Capital (depreciado)	R$ 31.800,70	20,147941
Custo fixo	R$ 32.635,26	20,676696
Custeio	R$ 25.560,00	16,194029
Ração	R$ 67.840,00	42,981335
Custo total	R$ 57.835,96	100

Tabela 10. Índices de produção e resumo da análise financeira (juros sobre o investimento e custeio, custos de produção e capital depreciado e receitas) na criação de tambaqui em cinco hectares de viveiros semiescavados com fundo de argila.

Índices de Produção	
Média de peso dos peixes (kg)	2,00
Biomassa final esperada (kg)	40.000,00
Custo/kg de peixe produzido (R$/kg) – Incluindo juros do financiamento	3,95
Custo/Unidade (R$)	7,89
Resumo da Análise Financeira	
Juros (7,44% a.a.) (R$)	31.683,90
Capital depreciado (R$)	31.800,70
Custeio + Custos fixos e Semifixos (R$)	126.035,26
Custos totais (Amortização + Custeio) (R$)	189.519,86
Receita Bruta (R$)	240.000,00
Receita líquida (R$)	50.480,14

B - Preparação de viveiros e qualidade da água

Assim como na recria, a qualidade da água nesta fase demanda de cuidado especial para a criação dos peixes (Boyd, 1982; Sipaúba-Tavares, 1994; Pereira & Mercante, 2005). A manutenção da água com qualidade boa é fundamental para o crescimento dos peixes, uma vez que nesta fase os índices zootécnicos devem ser otimizados com a finalidade de uma maior receita líquida.

Na Tabela 11, é possível observar um cronograma de adubação e calagem e os valores desejáveis dos parâmetros físico-químicos da qualidade da água para a criação de tambaqui em viveiros semiescavados com fundo de argila (Tabela 12).

Tabela 11. Adubação e aporte de calcário por hectare de lâmina de água*.

Período	*Sulfato de amônio/Uréia*	*Superfostato simples*	Calcário dolomítico
Início da produção	200 kg	100 kg	2000
30 dias	30 kg	25 kg	
90 dias	30 kg	25 kg	1000#
150 dias	30 kg	25 kg	
210 dias	30 kg	25 kg	

*: Dados fornecidos pela Agroindustrial tambaqui Ltda (2008).#: A adição de calcário nesta fase pode ser adiado de acordo com pH da água analisado no período.

Tabela 12. Valores médios ± desvio padrão dos parâmetros da qualidade da água, desejáveis para a engorda de juvenis de tambaqui.

Parâmetro observado	Variação
pH	6,0 ± 1,0
Temperatura (ºC)	26,7 ± 0,4
Condutividade elétrica (μS/cm2)	~ 40,0 ± 5,0
Oxigênio dissolvido (mg/L)	5,5 ± 1,0
Amônia total (NH3 + NH4) (mg/L)	Abaixo de 0,5 ± 0,01
Amônia não ionizada (NH_3) (mg/L)	Abaixo de 0,5 ± 0,01
Nitrito (mg/L)	Abaixo de 0,01 ± 0,001
Transparência (cm de profundidade)*	40 cm ± 10,0
Gás carbônico (mg/L)	Até 10,0
Dureza (mg de $CaCO_3$/L)	40-120

* Medição realizada com o disco de Secchi.

C - Oferta de alimento

Durante os primeiros seis meses de criação o alimento deve ser ofertado duas vezes ao dia na proporção de 3% da biomassa de peixe estocada. Após este período, a alimentação pode ser reduzida a proporção de 2% de biomassa estocada sem comprometer o crescimento dos animais. Entretanto, isso só deve ser feito se os índices zootécnicos permitirem, caso contrário, sugere-se manter a taxa de alimentação de 3% da biomassa estocada.

Considerações finais

A criação de tambaqui em viveiros semiescavados se apresenta como um sistema de cultivo viável, devido às seguintes razões: (1) não agride áreas de preservação permanente precisando apenas de reservatório de água para abastecimento (Resolução CONAMA 369/06); (2) a quantidade de efluente gerado é mínima devido aos viveiros só demandarem de água para reposição; (3) a renovação total da água só ocorre após quatro ciclos de produção (existem situações com mais de cinco safras que se troca total de água). Entretanto, a confecção de filtros pode permitir o reuso da água; (4) é um sistema de fácil confecção e com custo de instalação compatível com a rentabilidade da atividade e (5) otimiza as boas práticas de manejo (BPMs), como a facilidade para a realização das biometrias e acompanhamento zootécnico, da qualidade da água e despescas rápidas.

Referências

AGROINDUSTRIAL TAMBAQUI. 2008. *Manejo comercial da piscicultura semi-intensiva*. Local, xx p. (Boletim Técnico).

ARBELÁEZ-ROJAS, G. A.; FRACALOSSI, D. M.; FIM, J. D. I. 2002. Composição corporal de tambaqui, Colossoma macropomum, e matrinxã, Brycon cephalus, em sistemas de cultivo intensivo, em igarapé, e semi-intensivo, em viveiros. *Rev. Brasil. Zoot.*, 31:1059-1069.

BOYD, C. E. 1982. *Water quality management for pond fish culture.* New York: Elsevier.

BOYD, C. E. 1998. Pond water aeration systems. *Aquacul. Engin.*, 18:9-40.

GARG, S. K.; BHATNAGAR, A. 2000. Effect of fertilization frequency on pond productivity and fish biomass in still water ponds stocked with *Cirrhinus mrigala (Ham.). Aquacult. Res.*, 31:409-414.

GONÇALVES, J. S. 2005. Dinâmica da agropecuária paulista no contexto das transformações de sua agricultura. *Inform. Econôm.*, 35:12.

IGLÉCIAS, W. 2007. O empresariado do agronegócio no brasil: ação coletiva e formas de atuação política – as batalhas do açúcar e do algodão na OMC. *Rev. Soc. Polít.*, 28:75-97.

ITUASSU, D. R.; SANTOS, G. R. S.; ROUBACH, R.; PEREIRA-FILHO, M. 2004. Desenvolvimento de tambaqui submetido a períodos de privação alimentar. *Pesq. Agrop. Bras.*, 39:1199-1203.

IZEL, A. C. U.; MELO, L. A. S. 2004. *Criação de tambaqui (Colossoma macropomum) em tanques escavados no estado do Amazonas.* Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 20 p. (Série Documentos, 32).

MELO, L. A. S; IZEL, A. C. U. 2003. *Criação de tambaqui em barragens*. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental Série Documentos.

NUNES, E. S. S.; CAVERO, B. A. S.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R. 2006. Enzimas digestivas exógenas na alimentação do tambaqui. *Pesq. Agrop. Brasil.*, 41:139-143.

PARENTE, V. M.; OLIVEIRA-JÚNIOR, A. R.; COSTA, A. M. 2003. *Potencialidades regionais: estudo de viabilidade econômica: Sumário executivo*. Manaus: Superintendência da Zona Franca de Manaus.

PEREIRA-FILHO, M. 1995. Nutrição de peixes em cativeiro. In: VAL, L. A.; HONCZARIK, A. (Ed.). *Criando peixes na Amazônia*. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, p. 61-74.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. 1994. *Limnologia Aplicada à Aqüicultura*. Jaboticabal: FUNEP. (Boletim Técnico do CAUNESP)

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; FREITAS, A. M.; BRAGA, F. M. S. 1999. The use of mechanical aeration and its effects on water mass. *Rev. Brasil. Biol.*, 59:33-42.

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 3

Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura

Alexandre Nizio Maria, Hymerson Costa Azevedo & Paulo César Falanghe Carneiro

Resumo
O conhecimento sobre o armazenamento de sêmen de peixe vem avançando desde a década de 50. Neste artigo são apresentadas técnicas de processamento e armazenamento de sêmen de peixes, abordando sua importância como ferramenta tanto para programas de melhoramento genético de espécies de interesse econômico quanto para iniciativas de re-estabelecimento de populações em ambientes em recuperação. Informações sobre as particularidades do sêmen das diversas espécies de peixes permitem a padronização da técnica, definindo com isso os componentes dos crioprotetores e meios diluentes, bem como os procedimentos adequados para o congelamento e descongelamento. Avanços nessa área permitem a criação de importantes bancos de sêmen de peixes nativos, criando inclusive uma nova perspectiva para o agronegócio da piscicultura.

Abstract
The knowledge on fish semen storage has been improved since the beginning of the 1950 decade. This paper presents techniques on fish semen process and storage, indicating its importance as a tool either for aquaculture genetic programs or maintenance of genetic diversity of fish populations that are endangered. Information about particularities on semen of different fish species allow the advance on techniques as cryoprotectants and extenders determinations, as well as adequate procedures and rates for semen freezing and thawing. Improvements in this area are of interest to promote the creation of important gene banks for native fish species. Advances in this area allow the creation of semen banks of native fishes and induce a new perspective to the commercial fish culture sector.

Introdução

A criopreservação é uma técnica que se utiliza de temperaturas extremamente baixas para manter a estrutura e funcionalidade de células e tecidos vivos, conservando-os geneticamente viáveis e reversivelmente inertes do ponto de vista metabólico (Pegg, 2007). O primeiro trabalho sobre congelamento de sêmen de peixe foi realizado por Blaxter (1953) para viabilizar o cruzamento de dois “tipos” de arenques que desovam em épocas diferentes do ano. Essa pesquisa, publicada há mais 50 anos, coincidiu com um sucesso semelhante em bovinos. Nos anos seguintes, uma indústria multimilionária foi desenvolvida para o sêmen congelado de animais domésticos, enquanto que, apenas recentemente, a criopreservação de sêmen de espécies aquáticas parece estar na fase de transição entre a experimentação e o mercado (Tiersch, 2003).

A tecnologia de congelamento de sêmen de bovinos pode ser considerada madura nos dias atuais. Essa tecnologia tem sido adotada pelos programas de inseminação artificial em todo o mundo devido, em parte, aos seus benefícios econômicos como o aumento da disponibilidade de sêmen e redução nos custos com transporte e manutenção de plantéis de reprodutores. Uma tecnologia madura é aquela que já está em uso durante um período suficientemente longo e a maioria das suas falhas iniciais e problemas inerentes já foram reduzidos ou eliminados (Wikpedia, 2009). Podemos considerar a cronologia de desenvolvimento do mercado maduro de sêmen de bovinos leiteiros como uma trajetória teórica do ciclo de vida para um futuro mercado de sêmen de peixes criopreservado (Figura 1). Comparativamente, à criopreservação do sêmen de bovinos leiteiros e de outros animais domésticos que atingiram sua maturidade e tem sido utilizado em nível comercial, o estágio de desenvolvimento tecnológico de sêmen conservado de peixes estão em algum lugar entre a concepção e a infância (Caffey & Tiersch, 2000).

Atualmente, muitas são as técnicas de manipulação de sêmen já estabelecidas para várias espécies de peixes, com especial destaque para as famílias characidae, prochilodontidae, anastomidae (Viveiros & Godinho, 2009), cyprinidae (Billard et al., 1995), siluridae (Legendre et al., 1996) e salmonidae (Scott & Baynes, 1980). Mesmo assim, com exceção da truta arco-íris e o salmão do Atlântico, ainda há muitas questões básicas para serem respondidas no que tange às técnicas de conservação de sêmen de muitas espécies tropicais de interesse econômico e ambiental (Carolsfeld et al., 2003a).

O presente capítulo apresenta informações sobre a criopreservação de sêmen de peixes e, além disso, aborda sua importância como ferramenta na conservação dos recursos genéticos da ictiofauna bem como sua aplicação no agronegócio da piscicultura.
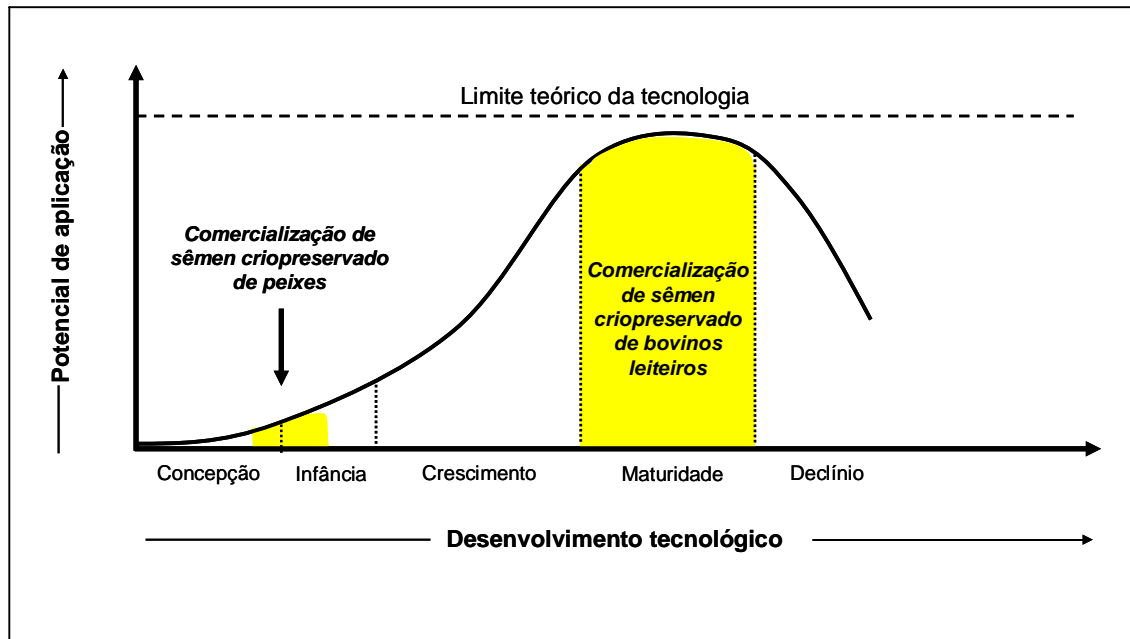
Figura 1. Estudo comparativo do ciclo de vida do mercado de sêmen criopreservado de bovinos e de peixe (Adaptado de Caffey & Tiersch, 2000).

A importância da conservação de sêmen de peixes para o agronegócio

No tocante ao agronegócio da piscicultura, há muitas vantagens no uso de técnicas de conservação de sêmen de peixes. Ao rever um pouco a história percebe-se que todas as espécies de animais e plantas tidas hoje como domesticadas passaram por um processo de cruzamentos iniciado e complementado continuamente com a participação de espécies silvestres. Os parentes silvestres das raças melhoradas têm genes necessários para o melhoramento continuado das espécies domesticadas de interesse econômico. Em vários casos eles oferecem genes para os quais não houve previsão de seu uso no presente, mas que podem ser importantes para a continuidade da produção de uma determinada espécie.

A manutenção de planteis de reprodutores de peixes com a finalidade de gerar descendentes para a produção nas pisciculturas depende da constante renovação de seus indivíduos e atenção para se evitar os riscos do endocruzamento. Endocruzamento é o acasalamento entre indivíduos de parentesco próximo e que leva à homozigose, presença de apenas uma forma do gene para uma característica particular. A homozigose não é necessariamente um problema, sendo muitos dos caracteres importantes de animais domésticos dependentes de características homozigóticas relacionadas, por exemplo, ao crescimento e produção de leite. Porém, a

homozigose de formas deletérias de genes é prejudicial e o endocruzamento tem maior tendência a acumular esta condição do que o cruzamento entre indivíduos sem parentesco (Tave, 1986).

Em aquicultura, problemas de consanguinidade, por exemplo, podem ocorrer como resultado de cruzamento seletivo que seleciona genes de interesse particular pelo endocruzamento, reduzindo a diversidade genética. Uma forma de contornar esses problemas é pela conservação do sêmen a baixas temperaturas, seja na forma resfriada ou congelada em bancos de germoplasma, mantendo o tamanho efetivo da população sem a necessidade de manutenção de um grande número de reprodutores no plantel e possibilitando ainda a redução nos custos de produção.

Sob refrigeração, os espermatozóides de peixes podem ser armazenados por algumas horas ou dias, dependendo da espécie, enquanto que mantidos em temperaturas negativas podem ser estocados por muitos anos (Billard et al., 2004). A refrigeração do sêmen possibilita sua estocagem por aproximadamente 10 dias, facilitando os trabalhos de rotina dentro de um laboratório de reprodução induzida e favorecendo a concentração dos esforços para o trabalho com as fêmeas. Adicionalmente, trata-se de uma técnica simples e de baixo custo que pode ser implementada nas pisciculturas voltadas à produção de alevinos. A técnica de refrigeração possibilita também a redução dos custos de manutenção do plantel de reprodutores, bem como trocas de material genético entre laboratórios (Carneiro et al., 2006).

A conservação de sêmen por longos períodos, possível pela técnica de criopreservação, tem como uma finalidade importante guardar genes para aumentar a variabilidade genética de uma determinada população. Da mesma forma que uma população natural de peixes depende de elevada biodiversidade genética para aumentar suas chances de adaptação ao meio onde vive, um programa de melhoramento genético precisa dessa variabilidade para diminuir possíveis efeitos negativos causados por endocruzamentos e homozigoses (Fauvel et al., 1998; Carolsfeld et al., 2003b) e para transmitir à população genes que poderão ser responsáveis por características importantes como resistência a doenças e a mudanças climáticas.

O congelamento do sêmen de peixes com nitrogênio líquido apresenta algumas limitações técnicas quanto à sua utilização para a produção de alevinos em larga escala em função da necessidade de determinação de metodologias para o armazenamento de grandes volumes de sêmen. No Brasil a utilização de sêmen congelado como rotina nas estações de piscicultura ainda é pouco difundida ou inexistente na grande maioria dos laboratórios. Por outro lado, trata-se de uma técnica muito valiosa para a preservação de material genético que pode ser utilizado em programas de melhoramento de espécies de interesse econômico ou mesmo em laboratórios públicos ou privados de produção de alevinos.

A criopreservação na conservação de recursos genéticos

São muitas as razões que justificam o uso de técnicas para o armazenamento de sêmen de peixes do ponto de vista da conservação de recursos genéticos. A agressão sofrida pelo meio ambiente nos últimos anos, em especial os ambientes aquáticos, vem afetando diretamente as

populações de espécies nativas de peixes. Mesmo antes de uma espécie de peixe entrar para a lista daquelas ameaçadas de extinção, muitas de suas características genéticas originais podem ter sido modificadas visando a sua adaptação ao ambiente alterado. Com o passar de algumas poucas gerações, algumas características genéticas podem até serem perdidas. As estratégias de recuperação da ictiofauna de corpos d'água que passam por período de reversão de um processo de deterioração podem ser grandemente auxiliadas por ações prévias de colheita e conservação do sêmen sob baixas temperaturas (Rana, 1995).

O tema reveste-se de grande importância, principalmente em função do notório declínio dos estoques pesqueiros causado pelas mais diversas razões tais como: a sobrepesca, poluição, uso conflitante da água, construção de barragens e reservatórios, extrativismo, além da introdução indiscriminada de espécies exóticas no ambiente. Adicionalmente, as mudanças climáticas recentemente intensificadas pela emissão de gases na atmosfera certamente estão tendo e ainda terão efeito na perda ou descaracterização de algumas populações de peixes que não são adaptáveis às temperaturas mais quentes das águas. A redução no número de indivíduos de uma determinada população reduz também a sua variabilidade genética, fazendo com que sua capacidade de adaptação a novos ambientes seja diminuída. O armazenamento de sêmen de peixes por longos períodos de tempo é uma ferramenta importante que possibilita a manutenção da variabilidade genética de uma população para uso futuro. Sua utilização numa eventual tentativa de recuperação de uma população de peixes garante uma base genética mais ampla, produzindo indivíduos com maior capacidade de adaptação e menores chances de sucumbir diante das alterações causadas no meio ambiente (Carolsfeld et al., 2003b).

Biologia espermática de peixes

Os espermatozóides de peixes variam em estrutura (Jamieson, 1991), refletindo sua história evolutiva de mais de 550 milhões de anos (Janvier, 1999). Segundo Nagahama (1983), os espermatozóides podem ser morfologicamente subdivididos em cabeça, peça intermediária e cauda. A morfologia dos espermatozóides parece refletir o seu modo de fertilização. Na maioria dos grupos de peixes falta o acrossomo, que ocorre em todos os outros grupos de vertebrados. A carência do acrossomo é compensada pela presença da micrópila, um orifício no córion do ovo para a penetração do espermatozóide (Cosson et al., 1999).

Apesar de apresentar grandes diferenças entre algumas espécies, o sêmen da maioria dos peixes possui uma característica em comum que é a ativação da motilidade espermática pela água. Os espermatozóides não apresentam motilidade, isto é, não apresentam movimento quando estão dentro dos testículos. A fertilização dos ovócitos somente ocorre após a ativação da motilidade dos espermatozóides que se dará após seu contato com a água. Normalmente a ativação é irreversível e a motilidade tem duração muito curta de tempo, após o que o espermatozóide fica incapaz de fertilizar o ovócito. As reservas energéticas do espermatozóide são exauridas rapidamente, sendo importante o conhecimento desse tempo para a espécie que está sendo trabalhada. Espermatozóides de salmão e truta nadam

vigorosamente por menos de um minuto ao passo que outras espécies como tilápias, dourado e a piracanjuba produzem sêmen que apresentam motilidade espermática de alguns minutos. Algumas espécies tropicais nativas de água doce de interesse econômico como o pintado, o curimbatá, o matrinxã, o piauçu e o pacu apresentam tempo muito curto de motilidade, excedendo pouco mais de um minuto (Marques, 2001).

Durante os procedimentos de desova em laboratório é comum a retirada dos gametas "a seco", evitando o contato com a água. A adição da água é feita somente após a mistura dos gametas, aumentando com isso as chances dos espermatozóides fertilizarem os ovócitos dentro do curto tempo em que permanecem ativos. Para o armazenamento do sêmen sob baixas temperaturas, portanto, é importante que seu congelamento seja feito sem que ele seja ativado, sendo imprescindível evitar seu contato com a água ou mesmo a urina do peixe durante sua extração (Harvey & Carolsfeld, 1993).

No congelamento de sêmen, são utilizadas soluções crioprotetoras compostas de um diluidor e um agente crioprotetor, como serão relatados a seguir, e estas são geralmente constituídas de soluções aquosas. Contudo esta solução deve ser elaborada de modo a não ativar o sêmen, sendo mais comumente feita a adição de glicose para regular a sua pressão osmótica e evitar com isso a ativação do espermatozóide. Na prática o desenvolvimento de uma solução crioprotetora para uma determinada espécie de peixe necessita de ensaios para a avaliação dos seus eventuais efeitos tóxicos e sua influência sobre a integridade e funcionalidade espermática. Resumidamente, quando misturado ao meio diluidor, o sêmen não deve estar móvel, mas a sua ativação deve continuar sendo possível com a adição de água no momento da fertilização após o armazenamento e descongelamento (Ohta e Izawa, 1996).

O efeito do congelamento nas células espermáticas

Algumas informações básicas sobre criobiologia são necessárias para a compreensão das injúrias que acontecem durante o congelamento e descongelamento, bem como para encontrar forma de evitá-las. O congelamento, tanto muito lento quanto muito rápido, tende a ser prejudicial às células. Quando qualquer célula em meio aquoso é submetida a temperaturas entre -5 e -15°C, ocorre formação de gelo no meio externo (cristalização), entretanto o conteúdo celular permanece líquido e supergelado. O calor latente do processo de cristalização eleva a temperatura para o ponto de congelamento do meio, isto é, -5°C. Como parte da água do meio extracelular é transformada em gelo, o meio se torna cada vez mais concentrado (hiperosmótico) em relação às células. Numa tentativa de manter o equilíbrio, a água do meio intracelular sai das células. Portanto, os eventos físicos que acontecem na célula dependem da velocidade de congelamento (Medeiros et al., 2002; Viveiros, 2005).

Quando o congelamento é feito em ritmo adequado, há tempo suficiente para a desidratação da célula e a saída da água, evitando-se com isso a formação de cristais em seu interior. Porém, muitas vezes esse processo não ocorre dessa maneira e há a formação de cristais de gelo intracelulares responsáveis por injúrias irreversíveis na célula. Por outro lado, durante congelamento excessivamente lento, as células são expostas por

muito tempo aos chamados "efeitos de solução", isto é, a todas as características de mudanças da solução extracelular como: a cristalização do gelo, a concentração de sal e elevação da osmolaridade, a alteração do pH, as alterações das composições das soluções em consequência dos sais atingirem seu ponto de saturação e cristalização, além de todas as implicações celulares desses eventos (Senger, 1986; Watson, 1995).

Diferentemente das hemácias, células com alta permeabilidade que possibilita rápida desidratação, o espermatozóide necessita da adição de substâncias com ação crioprotetora para o seu congelamento adequado (Suquet et al., 2000). As substâncias adicionadas para exercer função crioprotetora direta sobre a célula espermática são divididas em crioprotetores intracelulares e extracelulares. O crioprotetor intracelular é uma substância química não tóxica ou com baixa toxicidade capaz de retirar a água da célula e diminuir a temperatura de congelamento no seu interior, diminuindo ou impedindo a formação de cristais de gelo internamente. O produto mais conhecido e utilizado em sêmen de peixe é o dimetilsulfóxido (DMSO). Porém, outras substâncias como o glicerol, metanol e metilglicol também têm sido usadas para algumas espécies (Suquet et al., 2000; Maria et al., 2006b).

Os crioprotetores extracelulares revestem a célula externamente e estabilizam sua membrana, diminuindo os danos provocados pelo congelamento. São exemplo de crioprotetores celulares os açucares de um modo geral como a glicose, sacarose e trealose. De acordo com Denniston et al. (2000), o desempenho de um crioprotetor intracelular pode ser otimizado quando se associa crioprotetores de ação extracelular. Além de funcionar como fonte de nutrientes, a gema de ovo também tem ação crioprotetora por conter ácidos graxos e antioxidantes que auxiliam na proteção e conservação do espermatozóide (Carolsfeld et al., 2003b). Apesar disso, alguns pesquisadores não têm constatado benefícios no uso da gema de ovo em determinadas soluções crioprotetoras para sêmen de peixes, mostrando que existe uma importante interação deste componente com o diluidor utilizado (Maria et al., 2006a). Do ponto de vista sanitário é importante ressaltar que muitos países proíbem a comercialização e importação de sêmen diluído em diluentes com este componente biológico na sua composição.

O descongelamento é um procedimento inverso ao congelamento, porém que merece a mesma atenção. A velocidade de descongelamento do sêmen deve ser tal que permita a rehidratação celular, mas ao mesmo tempo seja breve o suficiente para evitar que pequenos cristais no interior da célula aumentem seus tamanhos durante esse processo e prejudiquem a célula. Como há muitas particularidades entre o sêmen das diferentes espécies de peixe, tanto a velocidade e temperatura de congelamento quanto de descongelamento devem ser determinadas após a condução de ensaios experimentais prévios (Fauvel et al., 1998; Billard et al., 2004).

Conservando o sêmen de peixes

A - Refrigeração

Os espermatozóides de peixes são apropriados para a conservação em curto prazo à temperatura de geladeira (0-6ºC), primeiro porque que são

imóveis no plasma seminal, não requerendo fontes imediatas de energia para seu metabolismo, e segundo porque não sofrem choque térmico, sendo mais tolerantes a baixas temperaturas do que os espermatozóides de mamíferos (Bobe & Labbe, 2008). Os espermatozóides mantidos em baixas temperaturas, ao redor de 4ºC, têm um baixo metabolismo e podem ser conservados por muitos dias em diluidores apropriados sem mudanças significantes na qualidade (Kime et al., 1996). Além disso, temperaturas abaixo de 6ºC reduzem drasticamente o crescimento bacteriano sendo, portanto, mais indicadas no armazenamento de sêmen em relação àquelas mais elevadas (Bobe & Labbe, 2008).

Os diluidores são soluções de sais ou de carboidratos que ajudam a manter a viabilidade das células durante o resfriamento. Uma solução diluidora deve ser utilizada no processo de resfriamento porque a diluição diminui a competição dos espermatozóides por oxigênio (O_2) e espaço (Carolsfeld & Harvey, 1999). Além disso, o uso de diluidores pode estabilizar as condições físico-químicas durante a estocagem do sêmen, prolongando a viabilidade dos espermatozóides. Para que as soluções funcionem bem como diluidores, algumas condições são exigidas: devem ser isotônicas em relação ao sêmen ou possuírem tonicidade que não ative a motilidade espermática, serem estáveis ao longo do armazenamento especialmente em relação ao pH e serem estéreis, inócuas e inibidoras da proliferação microbiana. A taxa de diluição ou proporção sêmen: diluidor normalmente utilizada está entre 1:1 e 1:10 e varia em função da concentração espermática da espécie, ou seja, espécies com sêmen apresentando alta densidade de células requerem maior diluição. Avaliações adicionais de diluidores e condições de estocagem são necessárias antes que a refrigeração de sêmen se torne uma ferramenta de rotina no manejo dos machos e na fertilização dos ovócitos. No Brasil existem poucos trabalhos sobre refrigeração de sêmen dos peixes nativos, mas algumas pesquisas têm obtido resultados promissores (Maria et al., 2006ab; Carneiro et al., 2006; Viveiros et al., 2009b).

O desenvolvimento de protocolos de resfriamento de sêmen, principalmente de espécies nativas, tem mostrado peculiaridades espécies-específicas, tanto para a duração do período de estocagem quanto para os diluidores usados. Os fatores mais importantes que determinam o sucesso do resfriamento são: velocidade de redução da temperatura, fornecimento e troca de gases, prevenção da desidratação ou dessecação e prevenção do desenvolvimento bacteriano. A adição de antibióticos em concentrações apropriadas pode prolongar o tempo de estocagem dos espermatozóides refrigerados prevenindo as infecções bacterianas (Segovia et al., 2000).

B - Criopreservação

O congelamento de células vivas pode ser feito basicamente de duas formas, pelo uso do gelo seco (neve carbônica ou dióxido de carbono sólido) ou do nitrogênio líquido. O gelo seco mantém as células na temperatura -79ºC enquanto que o nitrogênio líquido permite a manutenção da temperatura -196ºC. Este último método apresenta-se como o melhor meio para conservação de sêmen de peixe, e sêmen de outros animais, por longos períodos de tempo, facilitando inclusive sua identificação e diminuindo o risco de contaminação do material. O congelamento em gelo seco é feito pela

colocação de pequenas porções de sêmen diluído, previamente resfriadas, diretamente sobre pequenos poços feitos no bloco de gelo seco, formando os chamados "pelletes" de sêmen. Trata-se de uma metodologia pouco utilizada atualmente, porém que possibilitou a geração de muita informação sobre as particularidades de várias espécies anteriormente ao advento do nitrogênio líquido (Blaxter, 1953).

Trabalhar com nitrogênio líquido exige cuidados especiais e o conhecimento de duas de suas propriedades básicas: a baixa temperatura e a alta taxa de expansão. Por estar na forma líquida em -196ºC são necessários recipientes especiais para evitar grandes perdas por evaporação e equipamentos de proteção individual para sua manipulação como luvas e óculos. O fato de expandir-se rapidamente e ocupar volumes muito maiores quando na forma gasosa exige também que o recipiente que vai mantê-lo não seja lacrado totalmente. Nota-se, portanto, que o transporte de recipientes com nitrogênio líquido, normalmente representado por botijões especiais de diferentes tamanhos possui regulamentações internacionais por tratar de material perigoso. Atualmente para o transporte são utilizados botijões menores chamados de "dry shippers" que possuem material poroso absorvente na parede para reter o nitrogênio líquido, eliminando com isso o perigo de vazamento (Carolsfeld et al., 2003b).

Teoricamente a velocidade do metabolismo celular é nula a -196ºC e o tempo de armazenamento podem ser ilimitados em condições ideais de estocagem, que inclui basicamente a manutenção adequada do nível do nitrogênio líquido dentro do botijão e o manuseio correto das doses de sêmen criopreservadas. Porém, existem inúmeros detalhes importantes que devem ser observados para o sucesso no armazenamento do sêmen por longos períodos, desde a sua incorporação à solução protetora adequada, seu correto resfriamento anteriormente ao congelamento, seu congelamento propriamente dito e finalmente seu descongelamento e utilização.

O preparo da solução crioprotetora envolve primeiramente a diluição do crioprotetor intracelular, a exemplo do DMSO ou metilglicol, em concentrações de 5 a 10% na presença de glicose, geralmente em 5% para aumentar a pressão osmótica da solução e evitar a ativação do espermatozóide. A gema de ovo pode participar como um crioprotetor extracelular e, quando utilizada, é adicionada à solução crioprotetora. Para espécies de peixes ainda pouco estudadas sugerem-se ensaios prévios envolvendo a observação da motilidade do espermatozóide em microscópio utilizando-se ativadores como NaCl a 0,3% ou $NaHCO_3$ a 1% antes e após sua incorporação à solução protetora. A proporção sêmen:diluidor normalmente utilizada está entre 1:3 e 1:10 e varia em função da concentração final requerida para a fertilização. Esta por sua vez leva em conta o número de ovos que se deseja fertilizar com cada dose armazenada individualmente.

No acondicionamento das amostras de sêmen é importante que se leve em consideração a taxa de congelamento e a identificação da amostra. Atualmente, alguns diferentes tipos de recipientes têm sido utilizados como criotubos plásticos, tubos de vidro e ampolas, e palhetas plásticas. As diferentes formas e materiais desses recipientes resultam em diferentes propriedades de transferência de calor durante o congelamento e descongelamento. Mesmo dentro de recipientes com o mesmo modelo,

diferenças podem existir entre os produtos de diferentes fabricantes, o que pode resultar em variação na taxa de congelamento e descongelamento (Yang & Tiersch, 2009). Portanto, é necessário padronizar o método de embalagem para garantir que os protocolos sejam replicados de forma similar nos diferentes laboratórios (Figura 2).

A forma mais utilizada para manipulação dessas doses para o armazenamento envolve o emprego de palhetas plásticas francesas de 0,5 mL que podem ser acondicionadas organizadamente nos botijões criogênicos (Figura 2). Esse tipo de recipiente utilizado no acondicionamento do sêmen apresenta uma série de vantagens como a possibilidade de enchimento e fechamento automatizado, identificação da amostra a exemplo da impressão permanente de rótulos alfanuméricos ou código de barras, proteção (biossegurança) da amostra pela vedação completa, facilidade de transporte e racionalização de espaço e padronização de todo o processo (Yang & Tiersch, 2009).

A organização no armazenamento é importante para evitar a retirada e possível descongelamento de palhetas erradas ou adicionais àquela de interesse. Para tanto são feitas identificações individuais nas palhetas que por sua vez são colocadas em globetes ou cassetes plásticos ou ainda em raques de alumínio e, por fim, armazenadas nas canecas (ou “canisters”) dentro dos botijões criobiológicos (Ohta et al., 1997; Carolsfeld et al., 2003b; Billard et al., 2004).

A adição da solução crioprotetora ao sêmen pode ser feita suavemente nos próprios tubos graduados utilizados para a sua coleta, sendo que a homogeneização e envase é facilitada utilizando-se tubos de ensaio de 15 mL. O envase pode ser realizado logo após a diluição à temperatura ambiente ou após a refrigeração. O sêmen geralmente é refrigerado até a temperatura de 5ºC em gelo ou geladeira e em seguida congelado posicionando-se as palhetas em rampas horizontais e expondo-as inicialmente ao vapor e posteriormente à imersão direta no nitrogênio líquido para posterior armazenamento. Atualmente tem sido utilizada, com muito sucesso em várias espécies, a automatização do processo de refrigeração e congelação ou congelamento com grandes vantagens na uniformização e controle de qualidade do sêmen criopreservado. Na automatização, após a diluição e envase em temperatura ambiente, o sêmen é colocado em máquinas com curvas de resfriamento e congelação previamente programadas. Muitas dessas etapas podem ser eliminadas ou simplificadas quando for utilizado o “dry shipper” para algumas espécies, introduzindo-se as palhetas diretamente nos botijões após breve refrigeração e envase do sêmen diluído. Na vitrificação, técnica ainda em fase de desenvolvimento e expansão na tecnologia de sêmen é utilizada altas taxas de resfriamento e aquecimento, fundamentalmente removendo-se anteriormente o máximo possível de água das células através da adição de elevadas concentrações de crioprotetores o que induz a solidificação das células e previne a formação de cristais de gelo intra e extracelulares. De qualquer forma, o procedimento para criopreservação de sêmen deve ser padronizado previamente para cada espécie de peixe para definição da taxa de resfriamento mais adequada (Ohta & Izawa, 1996; Carolsfeld et al., 2003b).

Figura 2. Ilustração do roteiro utilizado durante a coleta, processamento, congelamento e descongelamento de sêmen de peixes até o momento da fertilização dos óvulos. (**A**) Indução hormonal da espermiação. (**B-C**) Coleta do sêmen dos machos em frascos limpos e secos por meio de suave massagem abdominal. (**D**) Manutenção do sêmen sob refrigeração (4-6ºC) até o processamento das amostras para o congelamento. (**E**) Verificação da qualidade do sêmen ao microscópio. A diluição do sêmen em soluções crioprotetoras é feita em seguida. (**F**) Palhetas para acondicionamento do sêmen diluído durante procedimentos de criopreservação. Congelamento do sêmen no vapor de nitrogênio líquido utilizando botijões tipo "*dry shypper*" (**G**), caixa de isopor (**H**) ou ainda em máquinas automatizadas específicas para congelamento de sêmen (**I**), onde se pode programar a velocidade de congelamento. (**J**) Armazenamento das amostras de sêmen congelado em botijões com nitrogênio líquido. (**L**) Banho-Maria utilizado para o descongelamento da amostra de sêmen vinda do botijão criobiológico por ocasião da fertilização. (**M**) Adição de sêmen descongelado em óvulos para posterior fertilização com a adição da solução ativadora da motilidade espermática.

Da mesma forma é importante também a determinação da taxa de descongelamento para uso do sêmen após o período de armazenamento em nitrogênio líquido. As palhetas normalmente são descongeladas por imersão em água no banho-maria. O sêmen congelado, ao ser retirado do botijão de nitrogênio líquido, deve ser imerso na água quente (45-60ºC) por poucos segundos (3-8) para que descongele uniformemente. Com macropalhetas ou

criotubos maiores, por exemplo, este processo se torna mais difícil porque o descongelamento não é uniforme, ou seja, a superfície descongela mais rápido que a porção central.

O procedimento de fertilização de ovos que se segue após o descongelamento do sêmen deve ser bem organizado para que o sêmen descongelado seja rapidamente misturado aos ovócitos e os espermatozóides ativados pela adição de água ou solução ativadora (Billard et al., 2004; Suquet et al., 2000). O procedimento de fertilização não deve ser demorado, pois a qualidade dos ovócitos diminui rapidamente após a desova. Em *Salminus brasiliensis*, por exemplo, as taxas de eclosão diminuíram de 80% para 5% em apenas 30 minutos após a desova, quando os ovos são mantidos em temperatura ambiente (24 a 26ºC) (Viveiros & Godinho, 2009).

Perspectivas futuras

No Brasil, há razões que apontam para um futuro onde será possível o emprego de sêmen criopreservado de peixes em atividades de rotina dos laboratórios de produção de alevinos. Os procedimentos de reprodução de nossas espécies reofílicas como o surubim, o matrinxã, o tambaqui, além de muitas outras, estão fundamentados na retiradas dos gametas, fertilização artificial e incubação dentro de estruturas que permitem alto grau de controle, diferentemente do que ocorre na indústria norte americana do bagre do canal, onde não há manipulação dos gametas separadamente, nem mesmo a fertilização artificial. No Brasil, os produtores de alevinos estão acostumados com uma rotina de laboratório onde os procedimentos lembram a inseminação artificial em bovinos, guardadas às devidas proporções. Essa analogia nos permite predizer que a utilização de sêmen criopreservado nos laboratórios de reprodução de peixes no Brasil está muito mais próxima do que o observado nos Estados Unidos e nos demais países onde a piscicultura encontra-se em estágio de desenvolvimento mais avançado. Esta comparação é possível, pois estes países utilizam, em muitos casos, espécies que não tem a fertilização artificial como prática de rotina de produção.

Um outro ponto importante que contribui para a incorporação da técnica de criopreservação de sêmen pela cadeia produtiva da piscicultura, é o fato da criação comercial de peixes ser relativamente nova em nosso País, tornando-se mais fácil a absorção de novas tecnologias por parte do setor produtivo, quando comparado às cadeias produtivas mais consolidadas e tradicionais.

Um dos entraves para a comercialização de sêmen de peixes nativos no Brasil é a necessidade de determinação de protocolos eficazes de manipulação e processamento desse material, o que exige conhecimento aprofundado das considerações feitas neste trabalho. Para melhorar o processo de desenvolvimento desses protocolos, maior ênfase deve ser dada na padronização das etapas e parâmetros que seguem: coleta e diluição do sêmen, determinação dos diluentes e crioprotetores, tempo de equilíbrio, taxas de resfriamento e descongelamento e proporção espermatozóides: ovo nos testes de fertilização (Mongkonpunya et al., 2000). A replicação de protocolos de criopreservação de sêmen de espécies nativas disponíveis na literatura não é uma tarefa fácil. Dados sobre a viabilidade pós-descongelamento são altamente heterogêneos mesmo comparando-se

estudos realizados dentro de uma mesma espécie como os demonstrados na Figura 3 (Bedore, 1999; Carolsfeld et al., 2003b; Streit Junior et al., 2006) nos quais os autores congelaram amostras de sêmen com a mesma solução crioprotetora, mas mesmo assim obtiveram resultados bastante divergentes, comprovando a necessidade de padronização da metodologia.
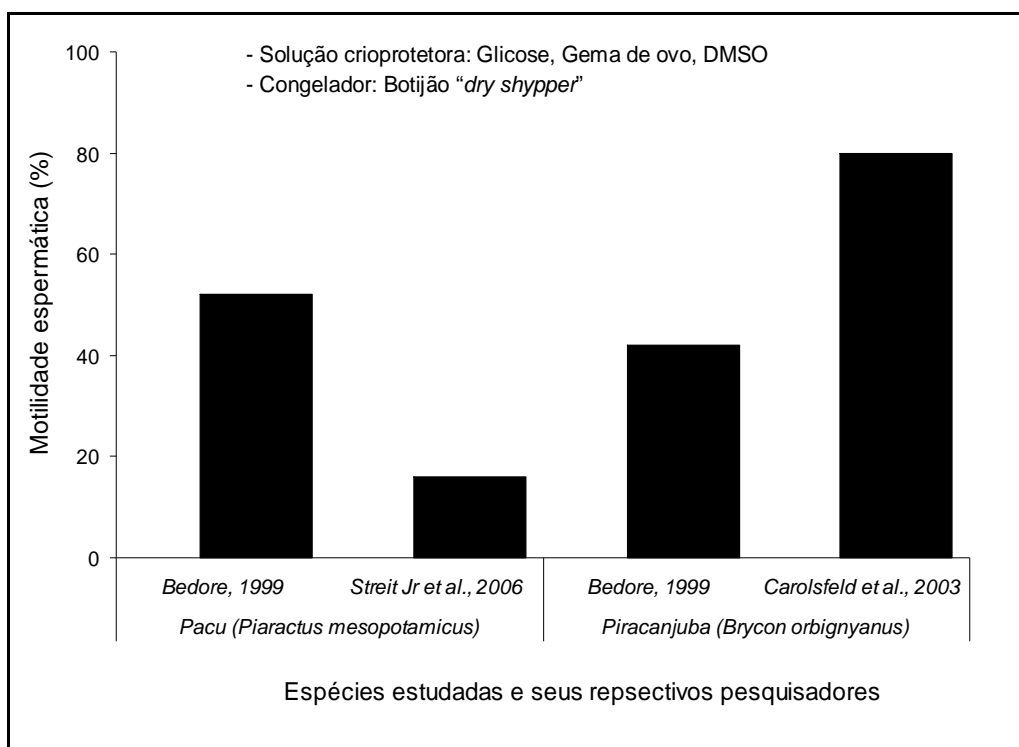
Figura 3. Variação na motilidade espermática pós-descongelamento no sêmen de duas espécies nativas brasileiras, em diferentes estudos.

Muitas são as perguntas que tem que ser respondidas, entre elas, como congelar a célula espermática de uma espécie brasileira conhecendo-se muito pouco sobre sua biologia? É necessário adquirirmos conhecimento sobre a biologia e fisiologia espermática básica e também conhecermos as características seminais ao longo do período reprodutivo para não realizarmos experimentações baseadas em tentativa e erro ou utilizarmos resultados de outras espécies. A variação sazonal da atividade espermatogênica provoca variações na quantidade e qualidade dos espermatozóides, assim como, a variação entre indivíduos provoca diferenças na fisiologia e composição bioquímica do sêmen (Fickel et al., 2007). Mudanças na qualidade

espermática em relação ao período de coleta têm sido relatadas não só em algumas espécies de peixes (Rana, 1995; Rouxel et al., 2008), mas também em mamíferos (Holt et al., 2005; Blottner et al., 2006) e anfíbios (Cabada, 1975).

Outro entrave atual no avanço das ações voltadas à comercialização de sêmen de peixes no Brasil é a necessidade de se trabalhar com um produto diferenciado com elevado valor agregado. O mercado demanda animais com desempenho zootécnico superior e melhor adaptados ao ambiente do cativeiro. Assim, torna-se imperativa a necessidade de linhagens de animais produzidos por programas de melhoramento genético para justificar o estabelecimento da comercialização de sêmen de peixes em nosso país. No final de 2008 foi iniciada a primeira ação voltada ao estabelecimento de um programa de melhoramento genético em nível nacional para o tambaqui que, em breve estará atendendo outras espécies nativas de interesse comercial com o surubim. O programa conta com muitas instituições de pesquisa e ensino, como também a participação da iniciativa privada, e tem como horizonte a geração das primeiras linhagens de animais melhorados disponíveis aos produtores em 5-6 anos. A importância das técnicas de criopreservação de sêmen de peixes é notória para o bom andamento do programa de melhoramento genético por facilitar e reduzir os custos nas transferências de material genético necessárias entre os locais onde suas atividades são desenvolvidas. Porém, a padronização e refinamento das técnicas de criopreservação serão fundamentais quando o sêmen de animais melhorados geneticamente estiver disponível para o agronegócio da piscicultura. Com o devido planejamento, as instituições de pesquisa nacionais podem, em alguns anos, estar prontas para fornecer ao setor produtivo a tecnologia necessária para estimular o surgimento de um novo segmento do agronegócio da piscicultura nacional representado por empresas privadas voltadas à comercialização de sêmen de peixes de alto desempenho zootécnico.

Referências

BEDORE, A. G. 1999. *Característica e conservação do sêmen de Pacu-Caranha (Piaractus mesopotamicus) e de Piracanjuba (Brycon orbignyanus)*. 53f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L. W.; SUQUET, M. 1995. Sperm physiology and quality. In: BROMAGE, N.R.; ROBERTS, R. J. (Ed.). *Broodstock management and egg and larval quality*. Cambridge: Cambridge University Press, Cambridge, p.53-76.

BILLARD, R. J.; COSSON, S. B.; NOVEIRI, M. 2004. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture*, 236:1-9.

BLAXTER J. H. S. 1953. Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, 172:1189-1190.

BLOTTNER, S.; WAGENER, A.; SCHÖN, J.; GÖRITZ, F.; FICKEL, J. 2006. Reproductive fitness in roe bucks (*Capreolus capreolus*): seasonal timing of testis function. *Eur. J. Wildl. Res.*, 52:9–13.

BOBBE, J.; LABBÉ, C. 2008. Chilled storage of sperm and eggs. In: CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, M. P. (Eds.). *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and freshwater species*. 1ª ed. FL, USA: Taylor & Francis Group, LLC, p. 219-236.

CABADA M. O. 1975. Seasonal variations in the fertilizing capacity of *Bufo arenarum* (Amphibia anura) spermatozoa. *Experientia*, 31:174-175.

CAFFEY, R. H.; T. R. TIERSCH. 2000. Economics and marketing of cryopreserved Fish Sperm. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. Cryopreservation in aquatic species (Eds). Baton Rogue: World Aquaculture Society, p. 388-408.

CARNEIRO, P. C. F.; SEGUI, M. S.; IÓRIS-FILHO, C. R.; MIKOS, J. D. 2006. Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. *Rev. Acadêm.*, 4 (3): (in press).

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; BAER, A.; ROSS, C. 2003a. Migratory fishes of South America: biology, social importance and conservation status, New York: *World Bank and Ottawa*-IDRC. 215p.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; GODINHO, H. P.; ZANIBONI-FILHO, E. 2003b. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *J. Fish. Biol.*, 63: 472-481.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. J., 1999. Conservação de recursos genéticos em peixes: teoria e prática. Curso de treinamento brasileiro. Tradução H. P. Godinho. Victória, Canadá: *World fisheries Trust*, p. 47.

COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DRÉANNO, C.; SUQUET, M. 1999. *Ionic factors regulating the motility of fish sperm*. In: GAGNON, C. (Ed.). The male gamete: from basic science to clinical applications. Viena: *Cache River Press*, p. 162-186.

DENNISTON, R. S.; MICHELET, S.; GODKE, R. A. 2000. *Principles of cryopreservation*. In. TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. (Eds.). *Cryopreservation in aquatic species*. Baton Rouge: World Aquaculture Society, p. 59-74.

FAUVEL, C.; SUQUET, M.; DREANNO, C.; ZONNO, V.; MENU, B. 1998. Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production conditions. *Aquatic Liv Res*, 11: 387-394.

FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. 2007. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *Eur. J. Wildl. Res*. 53: 81–89.

HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. 1993. Induced breeding in tropical fish culture. Ottawa: *International Development Research Centre*.

HOLT, W. V.; MEDRANO, A.; THURSTON, L. M.; WATSON, P. E. 2005. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology* 63:370–382.

JANVIER, P. 1999. Catching the first fish. *Nature*, 402(6758): 21-22.

KIME, D. E.; EBRAHIMI, M.; NYSTEN, K.; ROELANTS, I.; RURANGWA, E.; MOORE, H. D. M.; OLLEVIER, F. 1996. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish: application to effects of heavy metals. *Aquatic Toxicol.*, 36(3/4): 223-237.

LEGENDRE, M.; LINHART, O.; BILLARD, R. 1996. Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. *Aquatic Liv. Res.*, 9: 59-80.

LEUNG, L. K. P.; JAMIESON, B. G. M. 1991. Live preservation of fish gametes. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed). *Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa*. Cambridge: *Cambridge University Press*, p. 245–269.

MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; FREITAS, R. T. F.; OLIVEIRA, A. V. 2006a. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture*, 260:298–306.

MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; OLIVEIRA, A. V.; MORAES, G. F. 2006b. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). *Anim Reprod* 3: 55–60.

MARQUES, S. 2001. *Preservação a curto prazo do sêmen de teleósteos neotropicais de água doce*. 98f. Dissertação (Mestrado de Zoologia de Vertebrados) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Programa de Pós Graduação em Zoologia, Belo Horizonte.

MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. 2002. Current status of sperm criopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57: 327-344.

MONGKONPUNYA, K.; PUPIPAT, T.; TIERSCH, T.R. 2000. Cryopreservation of sperm of Asian catfishes, including the endangered Mekong giant catfish. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, M. (Eds). *Cryopreservation in aquatic species*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, p. 108–116.

NAGAHAMA, Y.; The functional morphology of teleost gonads. 1983. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed). *Fish phisiology.* New York: Academic Press, p. 233-275.

OHTA, H.; IZAWA, T. 1996. Diluent for cool storage of the Japanese eel (Anguilla japonica) spermatozoa. *Aquaculture*, 142: 107-118.

OHTA, H.; IKEDA, K.; IZAWA, T. 1997. Increases in concentrations of potassium and bicarbonate ions promote acquisition of motility in vitro by Japanese eel spermatozoa. *J. Exp. Biol.*, 277: 171-180.

PEGG, D. E. 2007. Principles of Cryopreservation. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Ed). *Methods in molecular biology: Cryopreservation and freeze-drying protocols*. 2ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc.

RANA, K. 1995. Preservation of gametes. *In*: BROMAGE, N.R., ROBERTS, R.J. (Ed.). Broodstock management and egg and larval quality. Cambridge: *Cambridge University Press*, p.88-94.

ROUXEL, C.; SUQUET, M.; COSSON, J.; SEVERE, A.; QUEMENER, L.; FAUVEL, C. 2008. Changes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) sperm quality during the spawning season. *Aquaculture Research*, 39: 434-440.

SCOTT, A. P.; BAYNES, S. M. 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish Biol.*, 17: 707-739.

SEGOVIA, M.; JENKINS, J. A.; PANIAGUA-CHAVEZ, C.; TIERSCH, T. R. 2000. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. *Theriogenology*, 53(7): 1489-1499.

SENGER, P. L. 1986. Principles and procedures for storing and using frozen bovine semen. *In*: Morrow DA (Ed). *Current therapy in theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders, p.116-174.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. 1999. *Principles of cryopreservation*. In: Cooled and frozem Stallion Semen, Cap. 9.

STREIT JUNIOR, D. P.; BENITES, C.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R. P.; SAKAGUTI, E. S.; CALDIERI, R. F. 2006. Sêmen de pacu (*Piractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. *Ciên. Anim. Brasil.*, 7(3): 289-297.

SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J.; BILLARD, R. 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquacult Res*, 31:231-243.

TAVE D. 1986. Genetics for fish hatchery managers. Westport, CN: AVI Publishing.

TIERSCH, T. N. 2003. Cryopreservation: A new industry for aquatic species. *Louisiana Agricul.*, 46(4): 9.

VIVEIROS, A. T. M. 2005. Criopreservação de sêmen de peixes. In: XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Goiania. *Anais do XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*. Goiânia, v. CD.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P., 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol. Biochem.*, 35: 137-150.

VIVEIROS, A. T. M.; ISAU, Z. A.; FIGUEIREDO, H. C. P.; LEITE, M. A. S.; MARIA, A. N. 2009. Gentamycin controls bacterial growth during refrigerated storage of piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, semen. *J. World Aquacul. Soc.*, 2009 (In press).

WATSON, P. F. 1995. Recent developments and concepts in cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fértil. Dev.*, 7: 871-891.

Wikipedia. Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/Mature_technology. Acessado em: 06/05/2009.

YANG, H.; TIERSCH, T. R. 2009. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: Zebrafish, medaka, and *Xiphophorus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 149C: 224–232.

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 4

Incubação e desenvolvimento de peixes aplicados à piscicultura: necessidades e cuidados

Lenise Vargas Flores da Silva, Marisa Narciso Fernandes & Bernardo Baldisserotto

Resumo

O manuseio dos embriões e larvas, vazão das incubadoras, turbulência e qualidade da água afetam o desenvolvimento de peixes. Neste contexto, este capítulo apresenta além dos procedimentos e cuidados básicos com o período de incubação e desenvolvimento larval em peixes, alguns dados relacionados às respostas morfológicas durante a ontogenia inicial do jundiá Rhamdia quelen em função do pH, dureza e alcalinidade do ambiente de cultivo. Resultados mostraram que de 6 a 216 horas após eclosão é o período crítico para o desenvolvimento do jundiá e portanto, período de extremo cuidado no manejo desta espécie. O desenvolvimento dos parâmetros morfológicos básicos não foi alterado pela qualidade da água. Entretanto, observou-se um crescimento potencial (alométrico) das características morfométricas em função do tempo em pH 7,0 e 8,0; exceto para a área do saco vitelínico. Houve maior absorção do saco vitelínico, crescimento em comprimento e área corporal em larvas cultivadas em pH 8,0 que em pH 7,0. Os resultados sugerem que o pH 8,0 é indicado para o cultivo de larvas de jundiá, e o aumento da dureza da água de 20 para 70 mg L^{-1} $CaCO_3$, principalmente nas concentrações de 20 mg L^{-1} Ca^{2+} e 5,59 mg L^{-1} Mg^{2+} aumenta a área corporal total das larvas em ambos pHs. A alcalinidade entre 63-92 mg L^{-1} $CaCO_3$ não influencia o desenvolvimento larval de jundiá. Portanto, estudos biológicos sobre a qualidade da água contribuem para o aprimoramento de técnicas de manejo para incubação e larvicultura de espécies brasileiras.

Abstract
The handling of embryos and larvae, hatchery flow, turbulence and water quality affect the fish development. Consequently, this chapter deals with the basic procedures related to fish hatchery and larval development and also presents some data regarding the morphological responses through the initial ontogeny of silver catfish Rhamdia quelen to different water pH, hardness and alkalinity. The obtained results indicated that the critical period for the development of this species is around 6-216 h. The development of the basic morphological parameters was not changed by water quality. However, there was a potential growth (allometric) of the morphological characteristics as a function of time at pH 7.0 and 8.0, except to the yolk sac. There was higher absorption of yolk sac, growth in length and body area in larvae maintained at pH 8.0 than 7.0. Results indicated that pH 8.0 is the best for raising silver catfish larvae, and the increase of water hardness from 20 to 70 mg L^{-1} $CaCO_3$, mainly at 20 mg L^{-1} Ca^{2+} and 5.59 mg L^{-1} Mg^{2+} increases total body area of the larvae at both pH. Alkalinity levels between 63-92 mg L^{-1} $CaCO_3$ does not alter silver catfish larval development. Therefore, biological studies applied to water quality contribute to the improvement of handling techniques for hatchery and larviculture of Brazilian species.

Introdução

Pelo menos 40 espécies brasileiras de peixes de água doce são utilizadas em aqüicultura, o que representa 1,5% de suas espécies conhecidas. Embora a produção brasileira de peixes cultivados venha crescendo, o ritmo de crescimento é menor do que o indicado pelo seu potencial. A variedade de história de vida apresentadas pelas espécies é um fator que dificulta sua exploração comercial conjunta. Além disso, outro fator limitante é a deficiência de dados científicos acerca de sua biologia reprodutiva. Entretanto, apesar da escassez de dados científicos de muitas espécies cultivadas, são encontrados alevinos à venda de espécies das quais não há quase nenhuma informação disponível. Em razão da deficiência de conhecimentos em biologia da reprodução, a Embrapa considera prioritária a estimulação de projetos de pesquisa nesta área (Godinho, 2007).

Com isto, cabe ressaltar a importância do conhecimento da biologia de peixes com o potencial produtivo devido a sua estreita ligação com o ambiente (Vazzoler & Menezes, 1992). O estudo morfológico aplicado à aquicultura fornece informações importantes sobre as fases do desenvolvimento embrionário e larval de peixes (Bengston, 1999). Os eventos ontogenéticos iniciais como o aparecimento e desenvolvimento das estruturas em geral, o período de eclosão e o início da alimentação exógena são usados para identificar o progresso do desenvolvimento em peixes (Ojanguren & Braña, 2003). O estudo destes eventos, além de proporcionar informações sobre a história de vida dos peixes, que ainda é pouco conhecida, também pode indicar parâmetros críticos para produção de espécies com potencial produtivo (Martinez & Bolker, 2003).

Nos estágios embrionários de desenvolvimento a regulação iônica é um parâmetro importante para o desenvolvimento dos peixes. A regulação iônica envolve sucessivamente: a membrana plasmática, a blastoderme (massa de

células embrionárias) e as células de cloreto, embora este plano básico possa não ser regra para todos os embriões de teleósteos. De acordo com esse modelo, o desenvolvimento da regulação iônica ocorre, a partir da eclosão, com a atividade das células de cloreto na superfície do corpo e, posteriormente, com a atividade dessas células no epitélio branquial e o desenvolvimento dos órgãos que auxiliam na osmorregulação, como o intestino e rim (Alderdice, 1988). Conseqüentemente, durante o desenvolvimento embrionário e larval (com o final da absorção do saco vitelino) ocorre uma mudança no número e distribuição destas células (Rombough, 1999).

Deve-se ressaltar que o entendimento das interações entre as variáveis químicas na qualidade da água e a regulação iônica é de fundamental importância para o cultivo de peixes, principalmente nas primeiras fases do desenvolvimento animal. Este fator pode afetar a sobrevivência das larvas e alevinos, pois estas são fases críticas, em que os peixes são suscetíveis às variações do meio por não possuírem bem desenvolvidas estruturas que auxiliam na adaptação às novas condições ambientais. A qualidade da água nos tanques de piscicultura é afetada dentre outros componentes químicos, pelo pH e a dureza (Wedemeyer, 1997). O pH da água afeta profundamente a manutenção da homeostase (Parra & Baldisserotto, 2007). A resistência de ovos e larvas de peixes de água doce em diferentes pHs apresenta interesse básico e aplicado. Alta ou baixa concentração de H^+ pode produzir alterações morfofisiológicas nas brânquias e superfície dos peixes (McDonald et al., 1991). Por exemplo, pHs ácidos resultam em alta taxa de mortalidade em peixes, pois afetam as junções paracelulares das células branquiais, facilitando a perda de íons, além de estimular uma produção excessiva de muco, podendo prejudicar as trocas gasosas (Wood et al., 1998). A abundância de células mucosas e de cloreto pode ser relacionada à concentração de íons do ambiente (Laurent, 1984). O aumento da concentração de Ca^{2+} (principalmente) e Mg^{2+} melhora a sobrevivência de peixes expostos à pHs ácidos (McDonald et al., 1980).

Os peixes de água doce (hiperosmóticos em relação ao meio) podem absorver diretamente o Ca^{2+} e o Mg^{2+} da água pelas brânquias, ou via intestino através da alimentação (Baldisserotto & Mimura, 1995; Parra & Baldisserotto, 2007). O Ca^{2+} exerce um papel fundamental na regulação iônica porque influi na permeabilidade das membranas biológicas, evitando o efluxo difusivo de íons para a água (Gonzal et al., 1987; Gonzalez, 1996). Estudos fisiológicos têm demonstrado que as células de cloreto são responsáveis pela absorção do Ca^{2+} nas brânquias dos peixes de água doce (Hwang et al., 1994). Contudo, o Mg^{2+} também pode influenciar no movimento iônico através da membrana celular atuando sobre a permeabilidade da membrana e sua principal via de absorção é o intestino, sendo as brânquias uma rota secundária de absorção. Entretanto, o mecanismo de absorção ainda não está totalmente esclarecido (Bijevelds et al., 1998).

Aparentemente, os efeitos da dureza da água sobre o crescimento em peixes variam de acordo com a espécie e a qualidade da água. Para espécies que são encontradas em ambiente natural de água dura (ou moderadamente dura) essa característica é necessária para um bom desenvolvimento,

enquanto que para espécies que naturalmente são encontradas em água mole, a água dura pode ocasionar efeitos deletérios ou condições não adequadas ao cultivo (Parra & Baldisserotto, 2007). Portanto, a avaliação de parâmetros de qualidade de água adequada ao desenvolvimento de cada espécie é necessária (Naddy et al., 2002).

Portanto, o conhecimento sobre o desenvolvimento, adaptações e estratégias reprodutivas em ambiente natural e de cultivo é um elemento imprescindível para nortear as medidas de gestão, manejo e preservação da ictiofauna, e bem como sua utilização na aquicultura. O estudo do padrão de desenvolvimento morfofisiológico, inclusive em relação à osmorregulação em ambientes diferenciados de cultivo pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias de cultivo. Neste contexto, será demonstrado ao longo deste capítulo os procedimentos e cuidados básicos com o período de incubação e desenvolvimento em peixes, e alguns dados relacionados às respostas morfológicas e morfométricas do jundiá (*Rhamdia quelen*) em função do ambiente de cultivo (Silva, 2006), contribuindo para os estudos e aprimoramento da produção desta espécie nativa brasileira de grande potencial produtivo.

Incubação

Existem vários tipos de incubadoras que podem ser utilizadas para a incubação dos ovos de peixes, mas a mais indicada é do tipo Zoug (que parece uma garrafa virada com abertura para baixo). As mais comuns à venda são de 20 e 60 L (Figura 1), mas existem de outros volumes. Estas incubadoras possuem um cano de abastecimento de água já aerada conectado à abertura, promovendo boa movimentação dos ovos na fase inicial e permitindo controlar a vazão de água de acordo com o desenvolvimento embrionário e larval. Também possuem uma tela de proteção, a qual é encaixada na incubadora. A densidade de ovos utilizada para incubadoras Zoug é variável dependendo da espécie a ser cultivada. Para o jundiá se utiliza em torno de 25 mL de ovos/incubadora de 60 L, correspondendo a 3.750 ovos/incubadora. Dados experimentais mostram bons resultados na incubação dos ovos em pequena escala em incubadoras adaptadas (usando garrafas de água mineral de 5L), onde o sistema de abastecimento de água é fechado e a aeração é direta. Contudo, este tipo de incubadora é inviável para grandes produções, devido à necessidade de mão-de-obra adicional. Neste sistema é importante o cuidado com a limpeza para evitar alta proliferação de fungos (comum na incubação de ovos de peixes), sendo necessária a troca diária de água e, principalmente, a retirada dos ovos mortos e membranas de ovos após a eclosão das larvas (Silva, 2004).

Figura 1. Incubadora tipo Zoug (60L). Notar sistema de abastecimento conectado a abertura basal em funil (promovendo a movimentação dos ovos). Foto: cedida pela Estação Experimental de Piscicultura da URI-Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai- Frederico Westphalen-RS.

Silva et al. (2004) destacam que além da limpeza são necessários outros cuidados durante a incubação dos ovos, como:

a)Vazão (renovação de água): a vazão recomendada para incubadoras tipo Zoug é de 0,5-1 a 10L/min, mas para o jundiá uma vazão de 0,8 a 5L/min apresenta bons resultados.

b)Aeração: a concentração de oxigênio dissolvido na água é muito importante para o bom desenvolvimento do embrião. Valores de 6-8 mg/L de oxigênio dissolvido proporcionam bom desenvolvimento dos ovos. Deve-se evitar muita aeração diretamente sobre os ovos, pois pode ocorrer acúmulo de bolhas de ar sobre os mesmos.

c) Reutilização da água: quando se tem sistema fechado de reutilização de água para incubação. Para estes sistemas é necessário possuir um biofiltro que proporcione a proliferação de bactérias para degradar a amônia liberada na fase de ovo. Neste sistema, a mesma água passa por todas as incubadoras durante todo período de incubação (que para o jundiá é em torno de 27-36 horas na temperatura de 24-25^{o}C), e com isto a amônia pode acumular e prejudicar a incubação.
d) Sólidos em suspensão: materiais em suspensão como a argila causam problemas na incubação, pois aderem na membrana do ovo, prejudicando as trocas iônicas e gasosas do ovo com a água.

Avaliações sobre a qualidade da reprodução

A - Porcentagem de fecundação

Após a disposição dos ovos nas incubadoras é importante para o produtor e/ou pesquisador estimar a percentagem de fecundação. Com isto ele poderá ter uma estimativa do sucesso da reprodução, pois se a porcentagem de fertilização for baixa (menos de 70%-80%), provavelmente a fêmea não estava com os oócitos no período de maturação correto (isto é indicado pelo número de ovos brancos/mortos, ou seja, provavelmente não fecundados). Contudo, cabe destacar que este procedimento é possível quando é feita a extrusão, ou se após a desova natural for coletado todo volume de ovos da incubadora, pois necessitamos do volume total de ovos liberados pela fêmea para fazer o cálculo.

Este procedimento, chamado de volumetria, será demonstrado a partir de exemplo descrito a seguir:

- Após a extrusão e fecundação artificial (mistura do esperma aos oócitos, a seco) e hidratação dos ovos (adição de água aos poucos e lentamente sobre a massa de ovos fecundada) devemos medir em uma proveta (1L) o volume total de ovos fecundados. Depois separar 5 mL dos ovos totais e contar os ovos mortos (ficam brancos) e os ovos viáveis (translúcidos ou transparentes) e com isto é possível fazermos a porcentagem de fecundação e estimar o número de larvas que é possível de se obter.

Exemplo:

Total de ovos da desova: 484 mL

Separe uma amostra de 5 mL de ovos para realizar o cálculo da porcentagem de fecundação.

Número de ovos brancos na amostra – 199
Número de ovos viáveis na amostra – 600
Número total de ovos na amostra - 799
Taxa de Fecundação:
799 → 100%
600 → x
x = 75,1 % de fecundação

5 mL (volume da amostra) → 799
484mL (volume total da desova) → x
x = 77.343 ovos
Número estimado de larvas que nascerão:
77.343 x 0,751 (pois 75,1 % dos ovos foram fecundados) = 58.084 larvas

B - Período de eclosão

Depende da temperatura da água, sendo que quanto menor a temperatura, mais tempo irá demorar o desenvolvimento e consequentemente a eclosão. Neste período, o movimento do embrião é mais rápido devido à fricção mecânica, junto com a liberação de enzimas que auxiliam no rompimento da membrana do ovo.
saco vitelínico: é o local onde estão acumuladas as reservas provindas da mãe (o vitelo), na qual o embrião e a larva irão se alimentar durante todo o período de desenvolvimento embrionário e, após a eclosão, até que a boca e o trato digestivo estejam formados para começar a receber alimento externo. Quarenta e oito horas após a eclosão é visível a redução do saco vitelínico. Para que as larvas tenham um bom desenvolvimento inicial é importante que o ovo tenha acumulado uma boa reserva de vitelo, e para isto é importante uma dieta adequada e de qualidade para os reprodutores, principalmente para as fêmeas.

Desenvolvimento embrionário e larval

Assim como em outros vertebrados, os fatores genéticos, evolutivos (simetria) e quantidade de vitelo no oócito determinam o tipo de segmentação (clivagem). Em peixes este padrão inicial de segmentação é geralmente preservado, determinando semelhanças no início do desenvolvimento embrionário. De uma maneira geral a clivagem dos ovos de peixes é do tipo meroblástica ou parcial (início da divisão ocorre no polo sem vitelo) (Hickman et al., 2001).

Segundo Godinho (2007), a grande maioria dos teleósteos (peixes da Classe Actinopterygii), dentre os quais estão os peixes brasileiros de água doce utilizados na aquicultura, apresenta em geral as seguintes características reprodutivas: a) desenvolve oócitos e espermatozóides em sexos separados; b) é ovípara e libera ovos no meio aquático, onde são fertilizados; c) na maioria das espécies os embriões se desenvolvem sem cuidado parental, mas existem espécies que mostram cuidado parental de um dos pais ou ambos; d) os embriões contam com o vitelo para seu desenvolvimento; f) a ruptura da casca do ovo libera o embrião, agora denominado larva, cujo desenvolvimento ainda não está completo; g) o desenvolvimento larval se completa na pós-larva, em momentos definidos após a eclosão, de acordo com a espécie.

No jundiá, após a hidratação do ovo é possível visualizar duas partes distintas no ovo fertilizado: a parte que contém o vitelo e a membrana mais externa do ovo (córion). Na parte interna, ou seja, a que contém o vitelo, o

"miolo", é formado de duas partes: - polo animal, que dará origem ao embrião (com coloração amarelo escura) e a massa de vitelo - polo vegetativo, que irá nutrir o embrião durante a fase de desenvolvimento. O polo animal dará origem a um montículo de células com sucessiva proliferação (divisão celular) de 2, 4, 8, 16 e 32 células. Este conjunto de células tem uma forma de amora (*morus* em latim) e este estágio é chamado de mórula (neste estágio o ovo é muito sensível à agitação, pois pode ocorrer descolamento das células e, portanto, ocasionar a morte do embrião). Após a *mórula* ocorrem várias subdivisões celulares (onde cada célula é chamada de blastômero), e posteriormente surge uma cavidade de segmentação entre o vitelo e massa de célula, esta fase é chamada de *blástula*. A seguir, as células do blastoderma ("tecido" do embrião na fase de blástula) assumem uma forma de ferradura acima do vitelo, resultando na formação e definição completa do vitelo, esta fase é definida como *gástrula*. Estas células vão se proliferando e formando camadas mais espessas ao redor do vitelo e após ocorrerá o fechamento do blastóporo, uma pequena abertura que dará origem inicialmente à diferenciação da boca e esboço da cauda. Nesta fase se torna definida a cabeça, cauda e os primeiros segmentos do corpo. E após os tecidos e órgãos vão sendo definidos ao longo do desenvolvimento. O tempo para finalizar o desenvolvimento embrionário dependerá principalmente da temperatura da água (Silva, 2004).

Larvicultura

Woynarovich e Horvàt (1980) determinam como larva o período de vida compreendido entre a eclosão e o enchimento da bexiga natatória. Os registros dos eventos do desenvolvimento larval são de relevância para a larvicultura: tamanho à eclosão, presença de órgão adesivo, pigmentação da retina, abertura da boca, abertura do lúmen intestinal, flexão da notocorda, desenvolvimento das nadadeiras, enchimento da bexiga natatória e padrão de pigmentação cutânea (Santos & Godinho, 1994; 1996; 2002).

Assim como a maioria das espécies tropicais cultivadas, após 2 a 3 dias nas incubadoras as larvas de jundiá já aceitam alimento externo, estão mais pigmentadas e "fortes" e com isto podem ser transferidas para tanques devidamente preparados para larvicultura.

Como descrito por Silva (2004), o procedimento de liberação das larvas no viveiro deve ser realizado com cuidado. O viveiro deve ser previamente preparado (oito dias antes) para receber as larvas. Em primeiro lugar devemos escolher um viveiro para cultivar somente larvas. Depois esvaziar este viveiro, utilizando procedimento de desinfecção com cal virgem (deixar o viveiro seco com cal virgem por três dias, exposto ao sol), depois aplicar calcário dolomítico (deixar mais dois dias), encher o viveiro com água e após cerca de cinco dias liberar as larvas com cuidado no viveiro. Checar o pH e a dureza da água para verificar se estão dentro de valores adequados. É importante lembrar de equilibrar a temperatura da água das larvas antes da liberação destas no viveiro (em baldes ou recipientes que serão colocadas as larvas para a transferência do laboratório para o viveiro: colocar a metade de água do viveiro e a outra de água do laboratório), com isto ocorre a homogeneização da temperatura e se evita choques térmicos. Contudo, é

importante ressaltar que quanto maiores as larvas, menor a chance de predação no viveiro. Então, se possível, é indicado cultivar as larvas dentro das incubadoras (por curtos períodos, 2 a 3 dias) ou mesmo em tanques ou caixas de água dentro de seu laboratório (oferecendo alimentação), antes de soltar no viveiro.

O comportamento de canibalismo entre as larvas de algumas espécies é preocupante na criação. Nas larvas de jundiá se observa canibalismo após três dias de eclosão, e se torna mais frequente após seis dias. O canibalismo é acentuado quando as larvas estão em baixa densidade, pois como em outros Siluriformes, as larvas demonstram ser territorialistas já nesta fase. A densidade adequada para a larvicultura do jundiá é de 10 larvas/L quando o cultivo é feito em laboratório (totalmente intensivo, com pouca renovação de água). Contudo, para viveiros e tanques externos de larvicultura recomenda-se cerca de 200 larvas/m^2.

Silva (2004) ressalta que os cuidados com fatores mencionados na incubação como: aeração e vazão também são válidas para a larvicultura, principalmente se as larvas permanecerem nas incubadoras por alguns dias. Se este for o caso, é importante reduzir a vazão para permitir que as larvas consigam nadar livremente sem esforço na superfície da água para se alimentarem normalmente. É preciso ter cuidado com o nível de oxigênio dissolvido (deve estar entre 6-8 mg/L) devido à vazão ter sido reduzida. Os outros parâmetros de qualidade da água, como: temperatura, pH e amônia, devem ser monitorados, assim como o cuidado com a proliferação de fungos.

A larvicultura é o ponto chave para a produção, pois se temos larvas bem alimentadas e saudáveis, consequentemente teremos sucesso na produção de alevinos. Além da qualidade do alimento a ser oferecido às larvas, a intensidade luminosa do ambiente de criação possui grande importância na larvicultura intensiva. No caso do jundiá, em ambiente escuro (1,2 lux) as larvas apresentaram maior ganho de peso e crescimento em comprimento total durante os primeiros 21 dias de vida. Dados demonstram que a sobrevivência durante a larvicultura em condições adequadas e controladas para cada espécie possibilita a adaptação ao meio de cultivo intensivo, desde que neste sejam oferecidas as condições mínimas de exigência das espécies.

Relações morfológicas e morfométricas de embriões e larvas de peixes e sua interação com ambiente de cultivo

O ambiente de cultivo pode influenciar nas características morfológicas e morfométricas dos estágios iniciais de desenvolvimento em peixes. Os estudos da ontogenia inicial e desenvolvimento em peixes permitem uma ampla base de dados para estudos comparativos como processos de formação citológica seguindo a fertilização, desenvolvimento dos órgãos e organização morfológica (Balon, 1990). A morfogênese e diferenciação são processos rápidos e complexos durante a ontogenia, pois quando as larvas eclodem ocorrem mudanças na forma do corpo, morfologia, metabolismo, habilidade natatória e comportamento relacionado à transformação das fases larvais em juvenis (Gisbert et al., 2002). Geralmente os estágios de descrição morfológica são baseados no aparecimento e desenvolvimento de caracteres

morfológicos específicos como: mandíbula, notocorda, tubo digestivo e filamentos branquiais, porque estes refletem diretamente o grau de desenvolvimento (Martinez & Bolker, 2003).

Muitos estudos na aquicultura estão relacionados estritamente ao comprimento e peso dos animais, mas não mostram relações com o desenvolvimento. A morfologia pode ser um indicador extremamente útil para melhoria das técnicas, principalmente em função de características morfométricas associadas com habilidade natatória, visão e alimentação (Gisbert et al, 2002). A investigação da morfologia e de taxas de sobrevivência de ovos e embriões pode estimar proporção de embriões anormais e com isto identificar a viabilidade do cultivo (Shields et al., 1997; Kjorsvik et al., 2003). O reconhecimento do padrão normal de desenvolvimento e a detecção de defeitos durante a formação podem melhorar as técnicas no cultivo de larvas através da modificação de parâmetros ambientais e práticas de alimentação (Gisbert et al., 2002).

O pH e dureza da água (Ca^{2+} e Mg^{2+}) são parâmetros ambientais que podem influenciar no cultivo de peixes. Vários estudos têm demonstrado que o aumento da dureza da água para valores de 20-70 mg L^{-1} $CaCO_3$ melhoram a sobrevivência de algumas espécies de peixes, principalmente durante os primeiros estágios de desenvolvimento (Gonzal et al., 1987; Ketola et al., 1988; Tucker & Steeby, 1993; Molokwu & Okpokwasili, 2002; Townsend et al., 2003; Silva et al., 2003; 2005). O Ca^{2+} e Mg^{2+} são os principais constituintes da dureza da água e possuem papel fundamental na regulação iônica reduzindo a permeabilidade das membranas biológicas e, conseqüentemente, o fluxo difusivo de íons para o meio aquático (Gonzal et al., 1987; Gonzalez, 1996; Van Der Velden et al., 1990). Mudanças de pH e/ou concentração de íons também podem proporcionar alterações fisiológicas nos estágios iniciais de desenvolvimento (Alderdice, 1988).

Com o intuito de demonstrar a aplicabilidade de estudos biológicos relevantes para a aquicultura é descrito a seguir uma parte de um trabalho científico que mostra claramente a importância e a determinação de fases críticas do desenvolvimento de peixes com potencial produtivo importantes de serem detectados para o manejo na aquicultura. O trabalho descrito por Silva (2006) teve como objetivo descrever a morfologia e morfometria de embriões e larvas de jundiá e avaliar a interação com o ambiente de cultivo, em pH neutro e alcalino com a alteração da dureza da água (em diferentes concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+}).

Após a fertilização os ovos foram mantidos em água com pH 7,0 e 8,0 com três diferentes concentrações de Ca^{2+}: Mg^{2+} da água (mg L^{-1}): dureza 20 mg L^{-1} $CaCO_3$ (5,0 Ca^{2+}: 2,08 Mg^{2}, controle) e dureza 70 mg L^{-1} $CaCO_3$ (20 Ca^{2+}:5,59 Mg^{2+} e 23 Ca^{2+}: 2,08 Mg^{2+}) a $24 \pm 1^{o}C$. Os ovos (24 horas após fertilização-hpf) e larvas (a cada 6 horas) de 6 a 48 e 216 h após eclosão (hpe) foram coletadas para avaliação quanto a caracteres morfológicos e morfométricos associados à visão (presença do olho), alimentação (desenvolvimento e funcionalidade do trato digestivo) e habilidade natatória (presença das nadadeiras).

Os caracteres morfométricos básicos como: área corporal total, área do saco vitelínico, comprimento total, comprimento da cauda, altura da cabeça e diâmetro do olho (Figura 2) foram medidos digitalmente (por “digital pad”,

pelo Programa Image Pro-Plus) utilizando um estereomicroscópio (Leica- CLS 150) com câmera digital acoplada (SONY- CCD-Iris). Todos os caracteres morfométricos analisados foram relacionados às fases de desenvolvimento (24 hpf, 6-216 hpe) por funções lineares ($y=a+bx$, y= parâmetro morfométrico e x= fase de desenvolvimento) e funções potenciais (alométricas, $y= aT^b$, a= intercepto, T= fase de desenvolvimento, b= coeficiente de crescimento). O crescimento alométrico em função do comprimento total foi calculado também através de $y= aCT^b$, onde CT= comprimento total, y= comprimento da cauda, altura da cabeça ou diâmetro do olho) e os dados de área foram analisados em função da área corporal total ($y= aAT^b$, quando y= saco vitelínico). Todas as medidas de comprimento foram feitas sob linhas perpendiculares ou paralelas ao eixo horizontal do corpo. As medidas de estimativa de área foram feitas através de perímetro percorrido (área total e área do saco vitelínico).
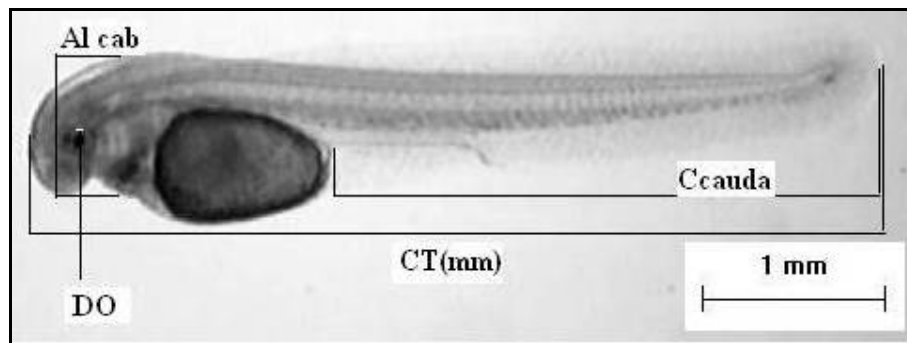
Figura 2. Larva de jundiá *R. quelen* 6 hpe (controle-pH 8,0). Parâmetros morfométricos: comprimento total (CT): comprimento da cauda (Ccauda), altura da cabeça (Alt cab), diâmetro do olho (DO). Silva (2006).

O desenvolvimento morfológico mostrou um padrão durante os experimentos independentemente do pH e dureza (Figura 3 e 4). Embriões de jundiá (24 hpf) apresentaram definição da cabeça, saco vitelínico e cauda com somitos. Com 27-36 hpf (24^{o}C) as larvas eclodiram, e com 6 hpe verificou-se a presença de várias estruturas importantes para o desenvolvimento como: boca e cavidade branquial aberta, brânquias rudimentares, olho pigmentado, rim, intestino rudimentar, esboço dos barbilhões, membrana da cauda que auxilia na natação. Em 12-18 hpe as estruturas tornaram-se cada vez mais desenvolvidas. Em 24 hpe, observou-se os barbilhões mandibulares (2 pares) e maxilares (1 par). Após 30 hpe o tubo digestivo mostrou-se mais definido (sugerindo o aparecimento do estômago) e com poro urogenital aberto. Em 36 hpe evidenciou-se maior pigmentação da pele. Entre 6-48 hpe ocorreu a absorção do saco vitelínico.

Em 48 hpe, se observou o maior desenvolvimento de todas as estruturas, principalmente do trato digestivo. A redução do saco vitelínico foi praticamente total, e com isto foi oferecida a primeira alimentação exógena. Em 216 hpe, todas as características observadas estavam mais desenvolvidas, exceto o saco vitelínico, que foi ausente. Dentre as características mais desenvolvidas acima, destacou-se as brânquias (com a presença das lamelas), trato digestivo funcional e as nadadeiras peitorais, indicando que as larvas com 216 hpe possuem as principais estruturas para um bom desenvolvimento.
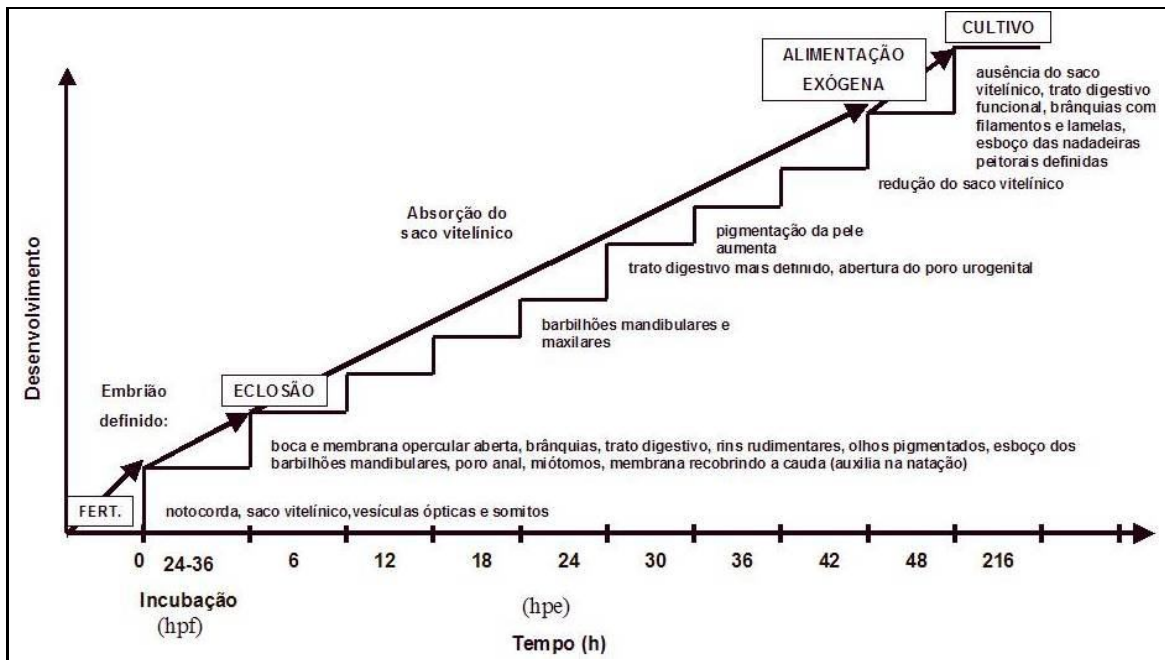
Figura 3. Esquema do desenvolvimento morfológico de embriões e larvas de jundiá *R. quelen* em função do tempo: 24-36 h após fertilização e 6-216 h após eclosão. Silva (2006).
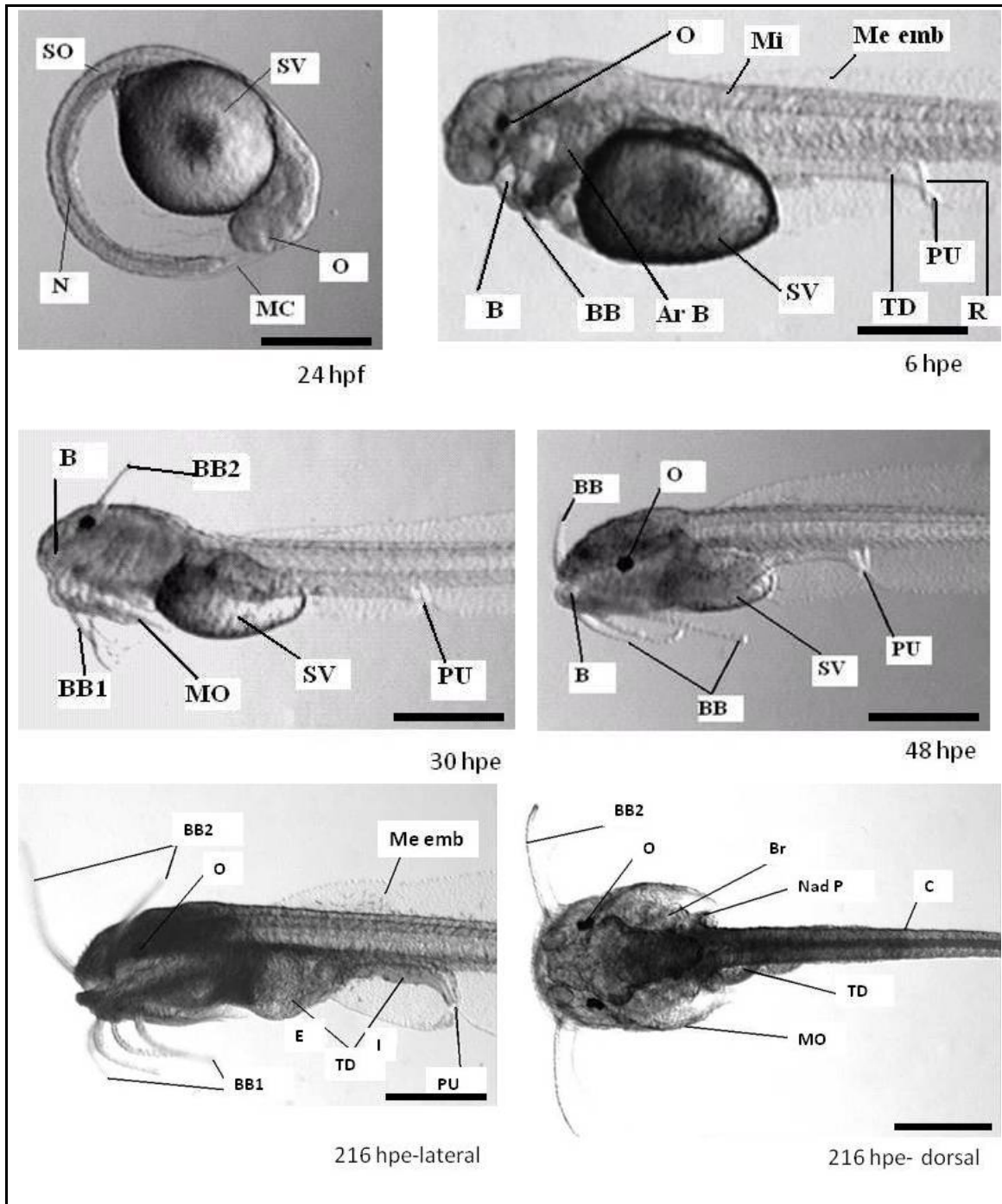
Figura 4. Desenvolvimento morfológico de larvas de jundiá *R. quelen*. Embrião- 24 h após fertilização (hpf); larvas 6, 30, 48 e 216 h após eclosão (hpe). **MC**- membrana coriônica; **N**- notocorda, **SV**-saco vitelínico, **B**-boca, **BB**- barbilhão (BB1- mandibular, **BB2**- Maxilar), **Ar B**- arco branquial, **Me ca**- membrana da cauda, **MO**- membrana do opérculo, **Mi**- miótomo, **TD**- trato digestivo, **E**- estômago, **I**- intestino, **R**- rim, **PU**-poro urogenital, **Nad P**- nadadeira peitoral. Escala= 1mm. Silva (2006).

A - Morfometria básica no desenvolvimento embrionário e larval em função do ambiente de cultivo

A área corporal total, área do saco vitelínico, diâmetro do ovo e altura da cabeça de embriões de jundiá 24 hpf não mostraram diferenças significativas em relação aos pHs e às concentrações de Ca^{2+}:Mg^{2+} (Tabela 1). A área do saco vitelínico foi significativamente menor em pH 8,0 entre 6-48 hpe, independente das concentrações de Ca^{2+}: Mg^{2+}. Em 48 hpe ocorreu interação entre o pH 7,0 e as concentrações de Ca^{2+}: Mg^{2+}, e o aumento da dureza resultou em uma diminuição da área do saco vitelínico. O saco vitelínico não foi observado em 216 hpe em ambos pHs (Figura 5B).

O valor de b (coeficiente de crescimento) nas relações alométricas com o comprimento total indicou que o aumento do diâmetro do olho, da altura da cabeça e o comprimento da cauda mostraram alometria positiva (b>1), e a área do saco vitelínico apresentou alometria negativa (b<1) em ambos pHs (Tabela 2). Entretanto, para o diâmetro do olho a correlação foi baixa (r^2= 0,54) em pH 8,0. Nas Figuras 5B, 6 e 7 estão indicadas as relações de crescimento que mais se adequaram ao longo do desenvolvimento em função do tempo nos pHs. Em geral, observou-se um crescimento potencial (alométrico) das características morfométricas em função do tempo em ambos pHs, exceto para a área do saco vitelínico, independente das concentrações de Ca^{2+}:Mg^{2+}. Principalmente, quando se considera o crescimento da área corporal total, comprimento total, comprimento da cauda e altura da cabeça em função das correlações significativas, exceto para o diâmetro do olho que não indicou correlação significativa em função do tempo para ambos pHs. O coeficiente de crescimento para os parâmetros em que se estabeleceu a relação potencial em função do tempo foi b<1, o que indica a tendência de redução da taxa de crescimento das estruturas ao longo do tempo. Contudo, o crescimento do comprimento total em função do tempo mostrou maior correlação em pH 8,0 (r^2= 0,98) do que em pH 7,0 (r^2=0,62).

Tabela 1. Área total do ovo (A.ovo), área do saco vitelínico (A.s.vit.), diâmetro do ovo (Di) e altura da cabeça (Alt.cab) de embriões de jundiá *R. quelen* 24 h após a fertilização (hpf) em função do pH 7,0 e 8,0 e concentrações de Ca^{2+}:Mg^{2+} da água. Valores expressam as médias ± erro padrão média (EPM).

Estágio de desenvolvimento		pH	Ca^{2+}:Mg^{2+} (mg L^{-1})	A. ovo (mm^2)	A. s.vit (mm^2)	Di (mm)	Alt. cab (mm)
Embrião	(24 hpf)	pH 7,0	5,0:2,08[1]	2,41±0,42	0,50±0,03	1,50±0,04	0,29±0,01
			20,0:5,59[2]	1,81±0,08	0,54±0,01	1,50±0,02	0,33±0,01
			23,0 :2,08[2]	1,88±0,11	0,53±0,01	1,58±0,03	0,32±0,02
		pH 8,0	5,0:2,08[1]	2,51±0,13	0,52±0,02	1,83±0,04	0,32±0,01
			20,0:5,59[2]	2,31±0,06	0,48±0,01	1,78±0,01	0,33±0,01
			23,0 :2,08[2]	2,34±0,05	0,50±0,01	1,81±0,03	0,30±0,01

Dureza da água- [1] 20 mg L^{-1} $CaCO_3$- controle. [2] 70 mg L^{-1} $CaCO_3$- com variação da concentração de Ca^{2+}:Mg^{2+} (mg L^{-1}). Letras diferentes no tempo indicam diferença significativa em relação às concentrações de Ca^{2+}:Mg^{2+}. * indica diferença significativa em relação ao pH 7,0. Silva (2006).

Tabela 2. Coeficiente de crescimento alométrico (*b*) e correlação (r^2) para os parâmetros de altura da cabeça (Alt cab), diâmetro do olho (D. olho) e área do saco vitelínico (A. s.vit) em função dos pHs (7,0 e 8,0) nas fases de desenvolvimento embrionário e/ou larval de jundiá *R. quelen*.

pHs	Á. s.vit (mm^2)	C. cauda (mm)	D. olho (mm)	Alt cab (mm)
pH 7,0	$y = 2,55AT^{-1,52}$ r^2=0,82	$y = 0,09CT^{2,13}$ r^2=0,84	$y = 0,001CT^{4,43}$ r^2=0,92	$y = 0,027CT^{1,94}$ r^2=0,80
pH 8,0	$y = 2,19AT^{-1,67}$ r^2=0,95	$y = 0,51CT^{1,01}$ r^2=0,97	$y = 0,008CT^{1,55}$ r^2=0,65	$y = 0,15CT^{1,02}$ r^2=0,84

Determinação de *b* através de $y = aCT^{b}$ ou $y = aAT^{b}$), *y*= parâmetro, *AT*= área corporal total, *CT*= comprimento total. Silva (2006).
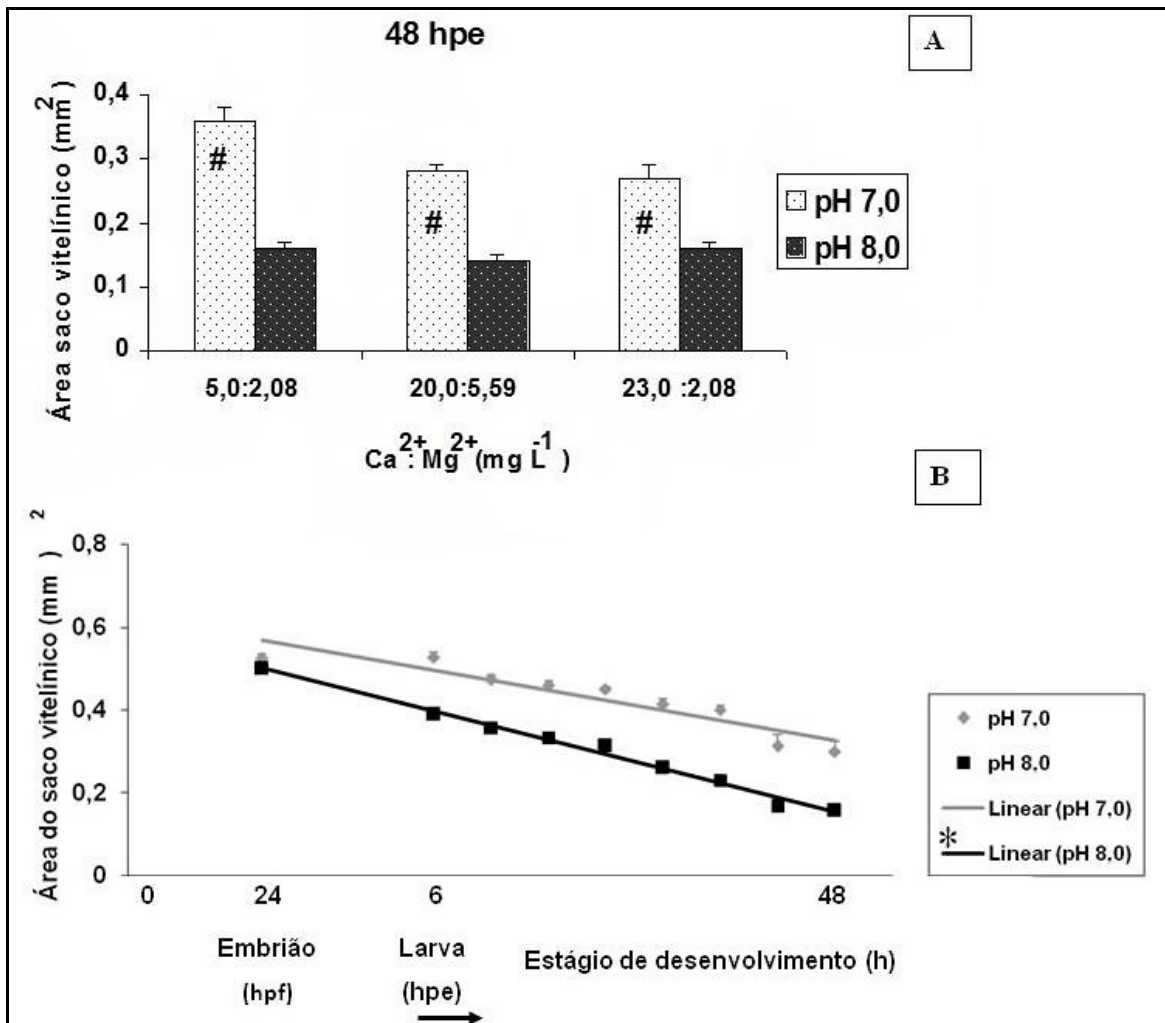
Figura 5. Área do saco vitelínico nos estágios de desenvolvimento embrionário e larval de jundiá *R. quelen* sob efeito do pH 7,0 e 8,0. A) Interação entre pH e Ca^{2+} : Mg^{2+} da água em 48 hpe; B) Relação linear da área do saco vitelínico em função do tempo em embriões: 24 hpf e larva: 6-48 hpe (a cada 6h) e após 216hpe. Regressões e correlações: pH 7,0: $y = 0{,}52 - 0{,}01x$ (r^2= 0,92) ($p<0{,}05$); pH8,0: $y = 0{,}38 + 0{,}01x$ (r^2=0,71) ($p<0{,}05$); hpf- horas após fertilização. hpe- horas após eclosão. Silva (2006).
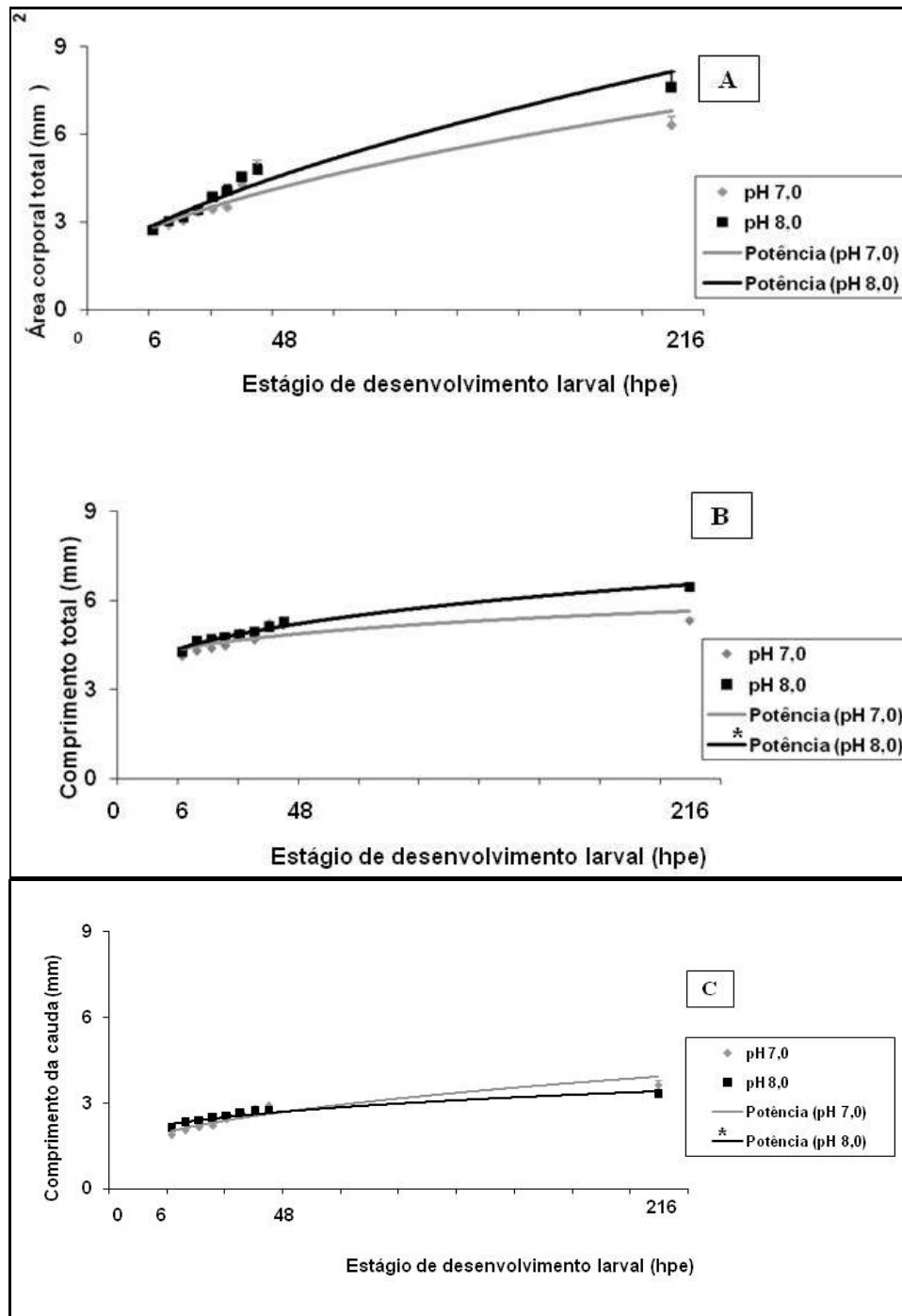
Figura 6. Parâmetros morfométricos básicos do desenvolvimento larval de jundiá *R. quelen* de 6-48 hpe (a cada 6 h) e após 216 hpe em função do pH 7,0 e 8,0. Curvas potenciais ($y=aT^b$, onde y= parâmetro medido, a= intercepto, *T* = tempo, b= coeficiente de crescimento) e correlações: (**A**) Área corporal total- pH 7,0: $y = 0{,}55T^{0,44}$ (r^2= 0,88) (p<0,05), pH 8,0: $y = 0{,}53T^{0,41}$ (r^2=0,96) (p<0,05); (**B**) Comprimento total- pH 7,0: $y = 2{,}69T^{0,13}$ (r^2= 0,62) (p<0,05), pH 8,0: $y = 1{,}97T^{0,22}$ (r^2= 0,98) (p<0,05); (**C**) Comprimento da cauda- pH 7,0: $y = 0{,}59T^{0,33}$ (r^2= 0,89) (p<0,05), pH 8,0: $y = 1{,}01T^{0,22}$ (r^2= 0,94) (p<0,05). Fonte: Silva (2006).
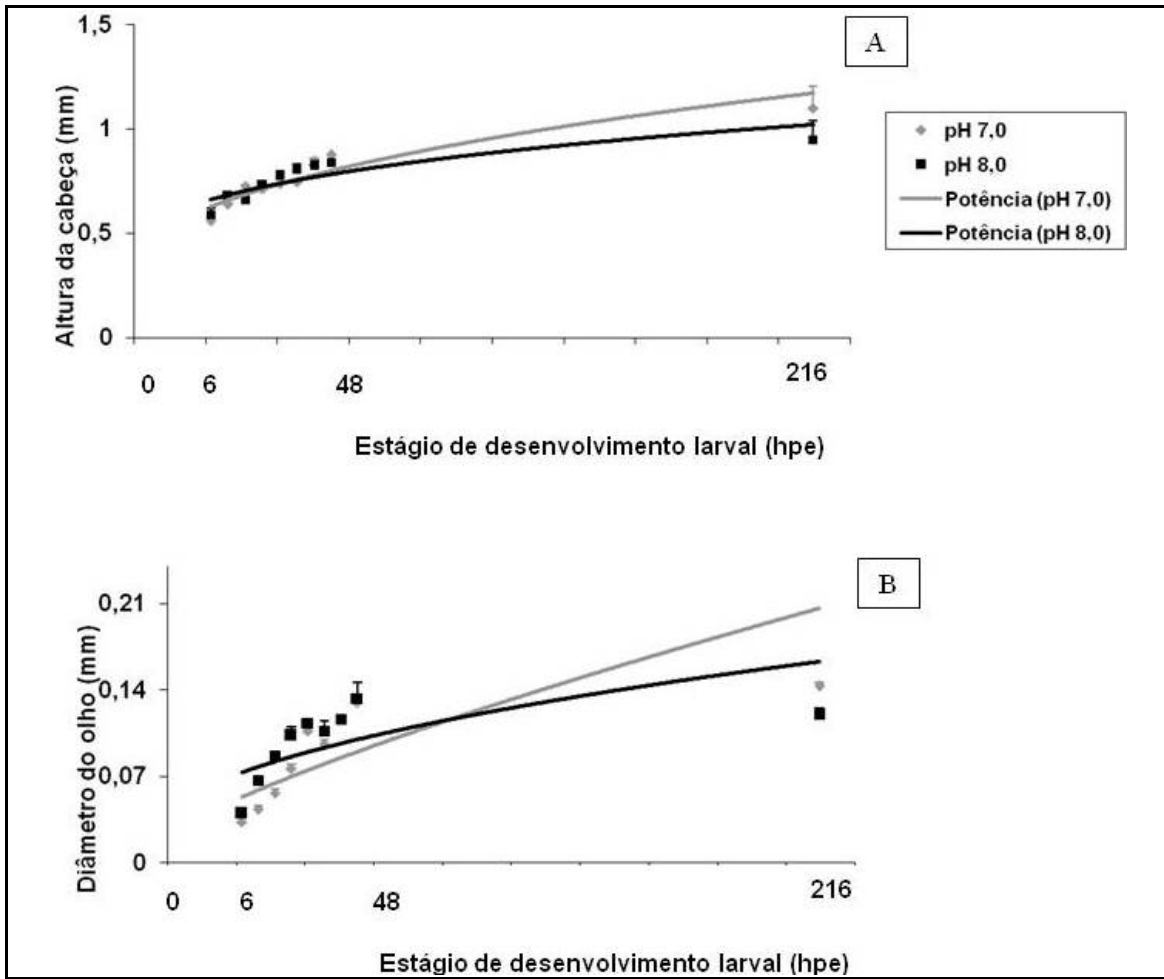
Figura 7. Altura da cabeça e diâmetro do olho ao longo do desenvolvimento larval de jundiá *R. quelen* de 6-48 hpe (a cada 6 h) e após 216 hpe em função do pH 7,0 e 8,0. Curvas potenciais (y=aT^b , onde y= parâmetro medido, a= intercepto, *T* = tempo, b= coeficiente de crescimento) e correlações: A) altura da cabeça- pH 7,0: $y = 0{,}19T^{0,32}$ (r^2= 0,89) (p<0,05), pH 8,0: $y = 0{,}30T^{0,21}$ (r^2= 0,77) (p<0,05); B) Diâmetro do olho- pH 7,0: $y = 0{,}01T^{0,48}$ (r^2= 0,57) (p>0,05), pH 8,0: $y = 0{,}03T^{0,28}$ (r^2=0,34) (p>0,05). Silva (2006).

Pereira et al (2006) pesquisaram os estágios iniciais de desenvolvimento do jundiá *R. quelen* e mostraram os mesmo padrões encontrados para este estudo com relação ao desenvolvimento embrionário e larval a 24 ^{o}C. Dados semelhantes de morfologia externa e sequência temporal dos eventos de crescimento foram encontrados em jundiás cultivados em pH 6,8-7,0 a 22-24 ^{o}C, nos quais o início da eclosão ocorreu

em 27 hpf e a absorção do saco vitelínico em 48-72 hpe, iniciando a alimentação exógena (Godinho et al., 1978; Cussac et al., 1985).

As larvas de jundiá cultivadas a 24°C mostraram semelhança no desenvolvimento também com o tambaqui *Colossoma macropomum*, principalmente em relação às brânquias, trato digestivo e saco vitelínico (com absorção completa 2-3 dias após a eclosão). As larvas de tambaqui, peixe comercialmente importante principalmente na região Amazônica, também necessitam completar o desenvolvimento após a eclosão, onde ocorre a formação dos olhos, mandíbulas e nadadeiras peitorais, organização muscular e pigmentação. A diferenciação e crescimento larval são extremamente rápidos (6 dias a 28 °C) e o desenvolvimento dos somitos ocorre em 12 hpf. Os arcos e filamentos branquiais, e trato digestório tornam-se mais desenvolvidos a 62 hpe. O saco vitelínico é completamente absorvido em 78 hpe (3 dias) (Vieira & Johnston, 1996).

A temperatura de cultivo das espécies é um fator importante a ser considerado na comparação do desenvolvimento morfológico (Ojanguren & Brãna, 2003). A absorção do saco vitelínico de larvas de *Pagrus pagrus* cultivadas a 12-18 °C ocorreu em 4 dias após a eclosão (Mihelakakis et al., 2001), o que mostra que a temperatura da água influencia o processo de absorção do vitelo para o crescimento. Para carpa-comum *Cyprinus carpio* o desenvolvimento embrionário-larval foi em 90 h (4 dias, em que apresentou 6 mm de comprimento) a 25 °C, e em temperaturas mais altas ocorre aumento do número de indivíduos com defeito após a eclosão (Linhart et al., 1995).

Bolker & Hill (2000) afirmam que a pigmentação é uma importante característica a ser analisada durante o desenvolvimento, pois pode mudar rapidamente em função do ambiente. Este autor indica que a pigmentação em embriões e larvas do linguado *Paralichthys olivaceus* apresentou dois momentos: num primeiro momento de estágio embrionário seguiu o modelo simétrico e o segundo momento, em função da metamorfose quando ocorreram mudanças em muitas estruturas e tecidos (olhos, linha lateral, tegumento) sugerindo uma assimetria. As larvas de jundiá têm uma pigmentação mais intensa a partir de 36-216 hpe (segundo momento), e esta não foi alterada em função das características experimentais de cultivo.

O desenvolvimento das características morfológicas de embriões e larvas de jundiá não foi alterado em função dos pHs (7,0 e 8,0) e das concentrações de Ca^{2+}: Mg^{2+} da água. O mesmo padrão morfológico de desenvolvimento embrionário-larval foi observado, evidenciando que o período mais sensível para o desenvolvimento das larvas desta espécie (6-216 hpe) está relacionado ao desenvolvimento das estruturas respiratórias e osmorregulatórias (brânquias, rim e trato digestivo). O início da alimentação exógena (48 hpe) representou outro ponto crítico para as larvas, seguido das modificações e adaptações necessárias para captura e capacidade de digestão do alimento externo (216 hpe) devido ao desenvolvimento e funcionalidade da boca e trato digestivo. A fragilidade das fases iniciais até a primeira alimentação provavelmente contribui para a alta mortalidade de larvas de jundiá (40%-50%) observada em fazendas de aquicultura que produzem esta espécie (Barcellos et al., 2004). Silva et al. (2003) identificaram que a sobrevivência após eclosão diminuiu (54-69%) quando comparado com a

percentagem de eclosão (63%-72%) em pH 8,0. Entretanto, Silva et al. (2005) verificaram alta sobrevivência após 21 dias de larvicultura (92%-94%) também em pH 8,0, corroborando com a análise de nosso estudo de que o período mais sensível para esta espécie possivelmente ocorre nos primeiros dias após eclosão (6-216 hpe).

O padrão de crescimento morfométrico do jundiá parece ser independente dos pHs e concentrações de Ca^{2+}:Mg^{2}. Contudo, o pH 8,0 indicou os maiores valores relacionados à maioria das características morfométricas avaliadas, exceto para o saco vitelínico, pois o consumo de vitelo foi maior (indicando menor área) neste pH. De acordo com os resultados o diâmetro do olho não segue um crescimento potencial em função do tempo para ambos pHs.

A dureza da água de 70 mg L^{-1} $CaCO_3$ proporcionou maior área corporal total em larvas de jundiá (216 hpe) nos dois pHs. O comprimento total não foi alterado pela dureza da água até 216 hpe. Silva et al. (2005) também não encontraram diferenças no crescimento desta espécie no mesmo período, nesta dureza, em pH 8,0. No entanto, estes autores mencionam uma diminuição do crescimento com o aumento do Ca^{2+} acima de 20 mg L^{-1}, em 21 dias após eclosão. Silva et al. (2003) e Townsend et al. (2003) sugerem que o aumento da dureza da água de 20 para 70 mg L^{-1} $CaCO_3$ em pH 8,0 aumentou a sobrevivência e o crescimento das larvas de jundiá logo após a eclosão e em 21 dias de cultivo. Silva et al. (2005) sugerem que concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+} acima de 25 e 7,11 mg L^{-1}, respectivamente, podem diminuir o crescimento das larvas de jundiá. Em nosso estudo as concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+} utilizadas foram abaixo destes valores.

Lopes et al. (2001) enfatizam que as maiores taxas de sobrevivência e crescimento para larvas de jundiá foram obtidas em pH 8,0 do que em pH 7,0 ou mais ácidos. Esse efeito é basicamente devido ao pH, uma vez que larvas de jundiá mantidas em alcalinidades de 63 e 92 mg L^{-1} $CaCO_3$ (dureza em torno de 20 mg L^{-1} $CaCO_3$) não apresentaram diferenças significativas em termos de crescimento, morfometria (Benaduce et al., 2008), ou respostas de fuga a predadores (Kochhann et al., 2009). Corroborando com estes autores, nosso trabalho também indicou que o comprimento total mostrou melhor correlação do crescimento em função do tempo em pH 8,0. Isto pode sugerir que as larvas crescem menos em pH 7,0 ao longo do tempo. Lopes et al. (2001), Silva et al. (2003) e Townsend et al. (2003) analisaram o crescimento das larvas de jundiá em comprimento total e peso, portanto dificultando a comparação com as outras características avaliadas neste estudo.

Gisbert et al. (2002), avaliando o desenvolvimento morfológico e morfométrico do linguado californiano *Paralichthys californicus* a 20 ^{o}C, sugerem que morfologia e os modelos de crescimento alométrico das regiões do corpo indicam a mudança dos fenótipos para alevino-adulto, em que ocorrem mudanças na pigmentação dos olhos, flexão da notocorda e aparecimento das nadadeiras. Estes autores mencionam que a metamorfose para esta espécie não foi completada em larvas até 10 mm. Contudo, sugerem que o crescimento alométrico positivo (em função do comprimento total), para as regiões da cabeça está associado ao desenvolvimento dos sistemas nervoso (cérebro), sensorial (visão, olfato e linha lateral),

respiratório (arcos e filamentos branquiais) e alimentar (esplancnocrânio) após a eclosão. Conseqüentemente, após a diferenciação neural e desenvolvimento das estruturas sensoriais (crescimento alométrico positivo dos olhos, desenvolvimento olfatório e neuromastos), as larvas são hábeis a reagir a estímulos de luz, detectar a presa e começar a se alimentar exógenamente quando reduzem as reservas do saco vitelínico. O desenvolvimento dos arcos e filamentos branquiais permite melhor absorção do oxigênio por via cutânea e branquial, resultando num maior suporte de oxigênio para aumentar a atividade natatória. Estes fatores, em conjunto com o desenvolvimento das mandíbulas, melhoram a capacidade de alimentação, aumentando o crescimento e as chances de sobrevivência das larvas (Hunt Von Herbing, 2001).

No presente estudo os resultados morfológicos e morfométricos indicam que o crescimento alométrico positivo de larvas de jundiá em geral sugere a proximidade do fenótipo de alevino-adulto. Entretanto, o desenvolvimento larval não foi completado a 216 hpe (em torno de 6 mm), inicialmente devido à ausência das nadadeiras dorsais e caudais (apresentando somente as peitorais). Contudo, o coeficiente alométrico (em função do comprimento total) para todos os parâmetros foi positivo para ambos pHs, exceto para a área do saco vitelínico, que possuiu coeficiente alométrico negativo. Este resultado é o esperado, pois esta estrutura reduz à medida que as larvas crescem em função do consumo do vitelo utilizado para o desenvolvimento inicial até o início da alimentação exógena.

Faustino & Power (2001) relatam que tanto o Ca^{2+} como o Mg^{2+} da água são essenciais para o desenvolvimento da coluna vertebral, nadadeiras e crânio (estruturas mineralizadas) no desenvolvimento de larvas de peixes. Neste contexto, a maior disponibilidade de íons na água de cultivo, desde que em concentrações adequadas à espécie, favoreceu o crescimento do comprimento da cauda e altura da cabeça, seguida principalmente pelo aumento da área corporal total em fase inicial de desenvolvimento das larvas de jundiá, otimizando o cultivo.

Portanto, de acordo com as análises morfológicas e morfométricas feitas em embriões e larvas de jundiá em função do ambiente de cultivo, Silva (2006) concluiu dentre outros resultados que o pH 8,0 é indicado para o cultivo de larvas de jundiá e a dureza da água de 70 mg L^{-1} $CaCO_3$, principalmente nas concentrações de 20mg L^{-1} de Ca^{2+} e 5,59 mg L^{-1} de Mg^{2+} favorece o aumento da área corporal total das larvas em ambos pHs.A morfologia em função da sequência de eventos temporais do desenvolvimento de 6-216 hpe é considerado como período crítico, ressaltando o início da alimentação exógena (48 hpe), sendo uma informação importante para pesquisadores e/ou produtores, na determinação de técnicas e manejo das fases iniciais de vida do jundiá e contribuindo para o estudo biológico desta espécie em ambiente de cultivo.

Considerações finais

O esclarecimento dos procedimentos e a determinação das necessidades e cuidados para o cultivo de fases iniciais de vida de peixes com potencial produtivo é de grande interesse aplicado a aquicultura. Cada vez

mais se comprova que o sucesso da criação de peixe está em conhecer a espécie e saber como criá-la, ou seja, oferecendo as melhores condições de vida ao animal proporcionando um ambiente semelhante ao natural. Para tal, como vimos ao longo do capítulo, o primeiro passo é conhecer a biologia básica da espécie e identificar os principais eventos que caracterizam os momentos de maior cuidado no manejo em função de desenvolvimento de estruturas chaves para a vida do animal e sua relação com a qualidade da água de cultivo. Isto possibilita estabelecer práticas de manejo adequadas ao desenvolvimento de peixes, como o período de transferência de ambiente, transporte, tolerância a choque térmico e exposição a turbulência da água. Portanto, os cuidados e necessidades associados a estudos morfológicos e morfométricos de fases iniciais de vida fornecem informações úteis para pesquisadores e/ou produtores, na determinação de técnicas e manejo em piscicultura contribuindo para o estudo biológico aplicado de peixes nativos brasileiros em ambiente de cultivo.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES pela bolsa de doutorado para L.V.F. Silva e CNPq, FAPESP pelo fomento à pesquisa. E a todos os colaboradores que de alguma maneira contribuíram para o andamento do trabalho, principalmente a Dra. Jaqueline Ineu Golombieski.

Referências

ALDERDICE, D. F. Osmotic and ion regulation in teleost eggs and larvae. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. 1988. *Fish Physiology XI the physiology of developing fish. Part-A eggs and larvae*. San Diego: Academic Press, p. 163-251.

BALDISSEROTTO, B.; MIMURA, O. M. 1995. Ion and water transport in the gut of the freshwater teleost *Prochilodus scrofa*. *Ciên. Cult. J. Braz. Assoc. Adv. Sci.*, 47:83–85.

BALON, K. 1990. Epigenesis of an epigenecist: the development of some alternative concepts on the early ontogeny and evolution of fishes. *Guelph Ichthyol. Rev.*, 4:1-48.

BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; FIOREZE, I.; CERICATO, L.; SOSO, A. B.; FAGUNDES, M.; CONRAD, J.; BALDISSERA, R. K.; BRUSCHI, A.; RITTER, F. 2004. Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. *Aquaculture*, 232:383-394.

BENADUCE, A. P. S.; KOCHHANN, D.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L.; BALDISSEROTTO, B. 2008. Toxicity of cadmium for silver catfish Rhamdia quelen (Heptapteridae) embryos and larvae at different alkalinities. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.*, 54:274-282.

BENGSTON, D. A. 1999. Aquaculture of summer flounder (*Paralichthys dentatus*): status of knowledge, current research and future research priorities. *Aquaculture*, 176:39-49.

BIJEVELDS, M. J. C.; VAN DER VELDEN, J. A.; KOLAR, Z.; FLIK, G. 1998. Magnesium transport in freshwater teleosts. *J. Fish Biol.*, 201:1981.

BOLKER, J. A.; HILL, C. R. 2000. Review paper: Pigmentation development in hatchery-reared flatfishes. *J. Fish Biol*., 56:1029-1052.

CUSSAC, V. E.; MATKOVIC, M.; MAGGESE, M. C. 1985. Desarrolo embrionário de *Rhamdia sapo* (Valenciennes, 1840) Eigenmann y Eygenmann, 1988 (Pisces, Pimelodidae) II. Oarganogénese media, organogénese tardía y eclosión. *Rev. Brasil. Biol*., 45:149-160.

FAUSTINO, M.; POWER, D. M. 2001. Osteologic development of the viscerocranial skeleton in sea bream: alternative ossification strategies in teleost fish. *J. Fish Biol*., 58:537-572.

GISBERT, E.; MERINO, G.; MUGUET, J. B.; BUSH, D.; PIEDRAHITA, R. H.; CONKLIN, D. E. 2002. Morphological development and allometric growth patterns in hatchery-reared California halibut larvae. *J. Fish Biol*., 61: 1217-1229.

GODINHO, H. P. 2007. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aqüicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Rev Bras. Reprod. Anim*., 31:351-360.

GODINHO, H.; FENERICH, N. A.; NARAHARA, M. 1978. Desenvolvimento embrionário e larval de *Rhamdia hilarii* (VALENCIENNES, 1840) (SILURIFORMES, PIMELODIDAE). *Rev. Brasil. Biol*., 38:151-156.

GONZAL, A. C.; ARALAR, E. V.; PAVICO, J. M. 1987. The effects of water hardness on the hatching and viability of silver carps (*Hypophthalmichthys molitrix*) eggs. *Aquaculture*, 64:111-118.

GONZALEZ, R. J. Ion regulation in ion poor waters of low pH. 1996. In: VAL, A. L.; ALMEIDA–VAL, V. M. F.; RANDALL, D. J. *Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon*. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

HICKMAN, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. 2001. *Princípios Integrados de Zoologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

HUNT VON HERBING, I. H. 2001. Development of feeding structures in larval fish with different life histories: winter flounder and Atlantic cod. *J. Fish Biol*., 59:767-782.

HWANG, P. P.; TSAI, Y. N.; TUNG, Y. C. 1994. Calcium balance in embryos and larvae of the freshwater adapted teleost, *Oreochromis mossambicus*. *Fish Physiol. Biochem*., 13:325-353.

KETOLA, H. G.; LONGAGRE, D.; GREULICH, A.; PHETTERPLACE, L.; LASHOMB, R. 1988. High calcium concentration in water increases mortality of Salmon and Trout eggs. Prog. *Fish Cultur*., 50:129-135.

KJORSVIK, E.; HOEHNE-REITAN, K.; REITAN, K. I. 2003. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 227:9-20.

KOCHHANN, D.; BENADUCE, A. P. S.; COPATTI, C. E.; LORENZATTO, K. R.; MESKO, M. F.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L.; BALDISSEROTTO, B. 2009. Protective effect of high alkalinity against the deleterious effects of chronic waterborne cadmium exposure on the detection of alarm cues by juvenile silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol*., 56:770-775.

LAURENT, P. 1984. Gill international morphology. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. *Gills, fish physiology*. 10 ed. London: Academic Press.

LINHART, O.; KUDO, S.; BILLARD, R.; SLECHTA, V.; MIKODINA, V. 1995. Morphology, composition and fertilization of carp eggs: a review. *Aquaculture*, 129:75-93.

LOPES, J. M.; SILVA, L. V. F.; BALSISSEROTTO, B. 2001. Survival and growth of silver catfish larvae exposed to different water pH. *Aquacult. Internat.*, 9(1):73-80.

MARTINEZ, G. M.; BOLKER, J. A. 2003. Embryonic and staging of summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *J. Morphol.*, 255:162-176.

MCDONALD, D. G.; HOBE, H.; WOOD, C. M. 1980. The influence of calcium on the physiological responses of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to low environmental pH. *J. Fish Biol.*, 88:109-131.

MCDONALD, D. G.; FREDA, J.; CAVDEK, V.; GONZALEZ, R.; ZIA, S. 1991. Interespecific differences in gill morphology of freshwater fish in relation to tolerance of low-pH environments. *Physiolog. Zool.*, 102:124-144.

MIHELAKAKIS, A.; YOSHIMATSU, T.; TSOLKAS, C. 2001. Spawning in captivity and early history of cultured red porgy, *Pagrus pagrus*. *Aquaculture*, 199:333-352.

MOLOKWU, C. N.; OKPOKWASILI, G. C. 2002. Effect of water hardness on egg hatchability and larval viability of Clarias gariepinus. *Aquacult. Internat.*, 10:57-64.

NADDY, R. B.; STUBBLEFIELD, W. A.; MAY, J. R.; TUCKER S. A.; RUSSELL, H. 2002. The effect of calcium and magnesium ratios on the toxicity of copper to five aquatic species in freshwater. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2:347-352.

OJANGUREN, A. F.; BRAÑA, F. 2003. Thermal dependence of embryonic growth and development in brown trout. *J. of Fish Biol.*, 62:580-590.

PARRA, J. E. G.; BALDISSEROTTO, B. 2007. Effect of water hardness on survival and growth of freswater teleost. In: BALDISSEROTTO, B.; MANCERA, J. M.; KAPOOR, B. G. *Fish Osmorregulation*. Eds. Enfield, USA: Science publisher.

PEREIRA, C. R.; BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; RITTER, F.; SILVA, L. B. 2006. Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 19824, Pisces, Teleostei) a south American catfish. *Braz. J. Biol.*, 66:1057-1063.

ROUMBOUGH, P. J. 1999. The gill of fish larvae. Is it primarily a respiratory or an ionoregulatory structure?. *J. Fish Biol.*, 55:186-204.

SANTOS, J. E.; GODINHO, H. P. 1994. Morfogênese e comportamento larvais do surubim (*Pseudoplatystoma coruscans* Agassiz, 1829) sob consições experimentais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 46:139-147.

SANTOS, J. E.; GODINHO, H. P. 1996. Larval ontogeny and swimming behaviour of leporin fish *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1874) under experimental conditions. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 48:109-116.

SANTOS, J. E.; GODINHO, H. P. 2002. Ontogenic events and swimming behaviour of larvae of the characid fish Salminus brasiliensis (Cuvier) (Characiformes, Characidae) under laboratory conditions. *Rev. Bras. Zool.*, 19:163-171.

SHIELDS, R. J.; BROWN, N. P.; BROMAGE, N. R. 1997. Blastomere morphology as a predictive measure of fish egg viability. *Aquaculture*, 155:1-12.

SILVA, L. V. F. 2004. Incubação e Larvicultura. In: BALDISSEROTTO, B.; RADÜNS-NETO, J. *Criação de Jundiá*. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, p. 107-115.

SILVA, L. V. F. 2006. *Morfologia, morfometria, distribuição de células mucosas e de cloreto em embriões e larvas de jundiá, Rhamdia quelen (Heptapteridae). Efeito do pH e concentrações de cálcio e magnésio na água*. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

SILVA, L. V. F.; GOLOMBIESKI, J. I.; BALDISSEROTTO, B. 2003. Incubation of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae), eggs at different calcium and magnesium concentrations. *Aquaculture*, 228:279-287.

SILVA, L. V. F.; GOLOMBIESKI, J. I.; BALDISSEROTTO, B. 2005. Growth and survival of silver catfish, *Rhamdia quelen*, (Pimelodidae) larvae at different calcium and magnesium concentrations. *Neotrop. Ichthyol*., 3: 299-304.

TOWNSEND, C. R.; SILVA, L. V. F.; BALDISSEROTTO, B. 2003. Growth an survival of *Rhamdia quelen* exposed to different levels of water hardness. *Aquaculture*, 215:103-108.

TUCKER, C. S.; STEEBY, J. A. 1993. A pratical calcium hardness criterion for channel catfish hatchery water supplies. *J. World Aquacult. Soc*., 24:396-401.

VAN DER VELDEN, J. A.; GROOT, J. A.; FLIK, G.; POLAK, P.; KOLAR, Z. I. 1990. Magnesium transport in fish intestine. *J. Fish Biol*., 152:587-592.

VAZZOLER, A. E. A. M.; MENEZES, N. A. 1992. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostaripphysi). *Rev. Brasil. Biol*., 52:627-640.

VIEIRA, V. L. A.; JOHNSTON, I. A. 1996. Muscle development in the tambaqui, an important Amazonian food fish. *J. Fish Biol*., 49:842-853.

WEDEMEYER, G. A. 1997. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge.

WOOD, C. M.; WILSON, R. W.; GONZALEZ, R. J.; PATRICK, M. L.; BERGMAN, H. L.; NARAHARA, A.; VAL, A. L. 1998. Response of an Amazonian Teleost, the tambaqui (*Colossoma macropomum*), to low pH in extremely soft water. *Physiol. Zool*., 71:658-670.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. 1980. *The artificial propagation of warm-water finfishe: a manual for extension*. Rome: FAO, (FAO Fish Tech Pap, 201).

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 5

Dieta: ferramenta importante para manejo dos peixes no cultivo

Laila Romagueira Bichara dos Santos & Eliane Tie Oba

Resumo

A realização de qualquer atividade requer gasto de energia e a reposição dessa energia é realizada via ingestão de alimentos. Proteínas, carboidratos e lipídios podem ser utilizados como fontes de energia, sendo as proteínas essenciais para o crescimento em peixes. Outros fatores como vitaminas e minerais também são importantes para a manutenção das atividades, crescimento e resposta aos estressores. Em piscicultura, há diversas fontes de estresse para os animais, como o aumento na concentração de matéria orgânica, o confinamento, a alta densidade de peixes e a concentração de oxigênio na água, que podem diminuir o crescimento dos animais por alterar seu metabolismo. Por isso, há necessidade de determinar as concentrações ótimas de cada componente alimentar para aumentar a resistência ao estresse e promover maior crescimento desses animais. Sendo assim, a formulação de dietas com todos os fatores nutricionais necessários a cada espécie é importante para que o produtor de pescado obtenha o crescimento dos animais em períodos mais curtos e com menor custo.

Abstract

All activity requires some energetic expenditure and the reposition of this energy is made by the food ingestion. Protein, carbohydrate, and lipids are the main source of energy, but protein is the most important to fish. Some other factors as vitamins and minerals are important to the maintenance of activity, growth and stress responses. Organic matter, confinement, high density of animals and oxygen concentration in the water are sources of stress in fish farm ponds that may change the animals' growth andmetabolism. Because of this it is very important determine the optimum concentrations of the diet components to increase the resistance to stress, growth and performance of fish. The diet formulation with all nutritional factors to which specie is important to culture and the production of fish with minimal costs and maximal performance.

Introdução

A performance de qualquer atividade a ser realizada requer gasto de energia e a reposição dessa energia é realizada via ingestão de alimentos. Proteínas, carboidratos e lipídios podem ser utilizados como fontes de energia, sendo as proteínas essenciais para o crescimento em peixes (Borba et al., 2003). Por isso, a dieta é fator essencial para o crescimento e manutenção de funções vitais, como respostas a estressores e defesas imunológicas de peixes. O funcionamento eficiente do organismo também depende da presença de certos lipídios e uma variedade de outros nutrientes (vitaminas e minerais) (Jobling, 1994), que podem ter seu requerimento alterado quando há alteração das condições da água, tais como temperatura e tensão de oxigênio.

A composição da dieta fornecida aos animais pode alterar inclusive a qualidade dos filés de peixe, produto final do processo de cultivo; por exemplo, a ausência de vitamina E na dieta gera danos à estrutura muscular, promovendo baixa qualidade do pescado. Por isso há a necessidade de determinar os níveis ótimos de cada nutriente para as diferentes espécies.

Muitos trabalhos determinam níveis tóxicos ou ideais utilizando parâmetros zootécnicos como crescimento e conversão alimentar, enquanto outros utilizam o estado de peroxidação das membranas celulares, principalmente no caso de vitaminas antioxidantes, como a vitamina E e C e micronutrientes como cobre, zinco e selênio. Sob o ponto de vista do produtor de pescado o mais importante é o crescimento dos animais em períodos mais curtos e com menor custo. Esta diminuição no período de tempo para se alcançar o crescimento dos peixes, pode ser obtida pela utilização de outros recursos como, por exemplo, manter os animais em natação constante em baixas velocidades (Oba, 2006). Além disso, muitos animais podem morrer ou despender maiores cuidados com tratamentos, caso sua alimentação não esteja adequada. A utilização de dietas adequadas ou balanceadas pode ser um pouco mais custosa, entretanto a taxa de conversão alimentar, por exemplo, pode ser maior que em dietas pobres em nutrientes.

Em pisciculturas há diversas fontes de estresse aos animais, como: aumento na concentração de matéria orgânica, o confinamento, a alta densidade de peixes e a concentração de oxigênio na água, que podem diminuir o crescimento dos animais por alterar seu metabolismo. Por isso há necessidade de determinar concentrações ótimas de cada componente alimentar para aumentar a resistência ao estresse e promover maior crescimento desses animais.

O custo da produção de peixes tem como um de seus principais componentes a dieta, que compromete 24,85% a 36,40% de seu custo total (Scorvo-Filho et al., 1998), assim sendo o melhor entendimento das características alimentares e necessidades nutricionais desses animais aperfeiçoam a piscicultura.

A utilização de dieta industrializada permite ao produtor melhor controle dos níveis de vitaminas, minerais e outros fatores na dieta. A quantidade de proteína presente na maioria das dietas varia entre 26%–32% para a maioria das espécies já estudadas. Porém, em espécies tropicais, que apresentam grande potencialidade para a piscicultura, há poucas informações

a respeito de suas exigências nutricionais. Em muitas espécies de peixes cultivados já foi observada grande relação entre o estado nutricional e imunológico.

Dentre os fatores que alteram o comportamento alimentar desses animais estão temperatura da água, tamanho do animal e qualidade da água (poluentes e tensão de oxigênio dissolvido). A ração geralmente é administrada diariamente e para animais cultivados em temperaturas próximas a 25^{o}C pode ser fornecida duas vezes ao dia, como observado em matrinxãs (Frascá-Scorvo et al., 2001; Santos & Yoshioka, observação pessoal), com comprovado aumento em seu crescimento.

Observou-se em curimbatá *Prochilodus lineatus*, que o aumento da temperatura de 20 para 30^{o}C promove uma redução na atividade de enzimas glicolíticas, que podem reduzir a disponibilidade de energia para esses animais (Carvalho & Fernandes, 2006), o que potencialmente prejudicaria seu crescimento. Essa mesma espécie apresentou menor tolerância ao cobre (maior CL_{50}-96h) na água quando aclimatada em 30^{o}C quando comparada a 20^{o}C, além de alteração em parâmetros hematológicos, que podem promover maior gasto energético e desvio dos nutrientes apenas para a manutenção da homeostase, prejudicando o crescimento (Carvalho & Fernandes, 2006). É necessário, em cultivo de peixes tropicais e amazônicos, o controle da temperatura da água dos tanques e também da frequência de alimentação. A alimentação em excesso não é recomendada, pois, além de ser mais cara (diminuindo a lucratividade do empreendimento), pode promover o excesso de matéria orgânica nos tanques, reduzindo a concentração de oxigênio e prejudicando o crescimento dos animais.

Assim, este capítulo pretende discutir brevemente todos os principais nutrientes necessários para a formulação de uma dieta para peixe. Porém, como a necessidade de muitos destes nutrientes pode variar de espécie para espécie, isso não será tratado em detalhes, apenas de forma geral.

Proteína e Aminoácidos

Muitos dos trabalhos realizados utilizaram salmonídeos e tilápias como parâmetros para a concentração utilizada de muitos nutrientes em peixes tropicais, no entanto, há diferenças em suas taxas de crescimento e tolerância a estressores como temperatura e tensão de oxigênio na água.

As proteínas representam uma importante fonte energética para os teleósteos (Weber & Zwingeslstein, 1995). Aminoácidos nas dietas são uma forma de gerar maior rendimento na produção de filé com menores custos, por isso a determinação de seus níveis ideais para animais de nossa fauna torna-se bastante importante. A maioria das dietas de peixes deve apresentar níveis de aminoácidos mais elevados em juvenis, em torno de 35%–50%, dependendo da espécie estudada. Os salmões, por exemplo, quando adultos requerem aproximadamente 15% de aminoácidos essenciais, mas quando juvenis esse requerimento pode subir para 50% (NRC – 1993).

Em matrinxã *Brycon amazonicum*, por exemplo, sua melhor taxa de crescimento é alcançada em 29% de proteína em sua dieta, porém a adição de outros fatores não protéicos, como lipídios, pode aumentar seu crescimento (Sá & Fracalossi, 2002).

Carboidratos

Como a maioria das espécies de peixes é onívora ou carnívora, os carboidratos não são a principal fonte de energia como em outros animais. Os carboidratos também são necessários na formulação das dietas de peixes, no entanto, as concentrações requeridas por cada espécie podem variar ainda mais, já que há muitas diferenças na utilização dos carboidratos como fonte energética em peixes. Em geral, a principal fonte energética de peixes são as proteínas e os lipídios, além de outros nutrientes como vitaminas e minerais. Por isso muitos poucos estudos foram realizados a fim de se conhecer o requerimento diário de carboidratos desses animais.

Em bagres, por exemplo, os carboidratos são uma fonte importante de energia e não requerem tanto lipídio na dieta quanto os salmonídeos (Lovell, 2002). Salmonídeos e trutas são bastante eficientes em obter energia de fonte protéica e lipídica, sendo que os carboidratos são pouco utilizados, por esse motivo os carboidratos, assim como a glicose, são incorporados sob a forma de glicogênio e reduzem o consumo alimentar e o crescimento desses animais (Dabrowski & Guderley, 2002).

Em casos de estresse como o jejum, os peixes geralmente mobilizam os lipídios como fonte de energia ao invés dos carboidratos. A truta arco-íris absorve cerca de 90% da glicose, mas a glicose digestível não apresenta o mesmo efeito de poupador de proteínas que os lipídios em casos de estresse.

Ácidos Graxos

Os lipídios também são importantes fontes energéticas para peixes, como salmonídeos e trutas, assim como as proteínas, entretanto, são ainda menos custosos para o produtor. Peixes não assimilam muito bem os carboidratos e seu excesso na dieta pode proporcionar reduzido crescimento e aumento na concentração de glicogênio no músculo, que proporciona pior qualidade ao filé de peixe. Dietas deficientes em ácidos graxos essenciais são a causa da maioria das doenças nutricionais em peixes cultivados (Tacon, 1996; Sutton et al., 2006). Dentre os sinais de deficiência de ácidos graxos essenciais estão redução de apetite e de crescimento.

Borba et al. (2003) não observaram aumento no crescimento de matrinxã após suplementação com ácidos graxos, porém, houve uma tendência de redução no consumo alimentar e, conseqüentemente, aumento na conversão alimentar. No entanto, estudos realizados com truta arco-íris e salmão obtiveram aumento de ganho de peso quando se utilizou 30% de ácidos graxos; nos salmões há redução da oxidação dos filés, com redução na descoloração do filé (Chaiyapechara et al., 2003; Hamre et al., 2004).

Alguns desses ácidos graxos, como o eicosapentanóico (EPA) e docohexanóico (DHA) são essenciais para o crescimento ótimo e desenvolvimento de peixes marinhos (Sargent et al., 1999, 2002). E devido a sua inabilidade ou, em alguns casos, menor habilidade de peixes em converter ácido linoléico (18:3, n-3) em n-3, ainda mais insaturados (Hamre et al., 2001; Mourente et al., 2002; Sargent et al., 1999), esses devem estar presentes em sua dieta. Tilápias requerem ácidos graxos da família n-6. A suplementação da dieta desses animais com óleos vegetais (milho e soja),

ricos em 18:2 n-6, produzem melhor desempenho que peixes marinhos alimentados com ácidos graxos n-3 (Takeuchi et al., 1979).

No entanto, esses ácidos graxos ricos em insaturações como EPA e DHA são mais susceptíveis a peroxidação lipídica e sua utilização pode afetar adversamente gerando doenças, se não houver um ~~o~~ cuidado com a geração de radicais livres (Mourente et al., 2002; Tacon, 1996). A peroxidação desses ácidos graxos pode alterar a fluidez da membrana, a função celular, a ação de receptores e enzimas e a permeabilidade a íons (Halliwell & Chirico, 1993). Algumas vitaminas como E e C, são importantes no processo de retirada de radicais livres, promovendo maior utilização desses ácidos graxos sem peroxidação das membranas (Halliell & Gutteridge, 1989). Ng et al. (2004) observaram que a substituição do óleo de peixe pelo óleo de palma em bagre do canal *Ictalurus punctatus* promove aumento do acúmulo de vitamina E nos tecidos e diminuição da oxidação do tecido muscular. Esse estudo sugere que há necessidade de balancear a quantidade de n-3 e n-6 em dietas para peixes, pois os ácidos graxos insaturados estão mais sujeitos à oxidação.

Vitaminas

As vitaminas são compostos necessários em quantidades pequenas para o crescimento, reprodução e saúde normais. São classificadas como hidrossolúveis (vitaminas do complexo B e a vitamina C) e lipossolúveis (vitaminas A, D, E e K) (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1993). Deficiência em vitaminas pode resultar em reduzida função imune e a demanda por elas também pode se elevar durante algumas condições fisiológicas como reprodução e estresse e ser alterada pela temperatura da água. Em geral, temperaturas elevadas requerem maior concentração de vitaminas (revisado por Woodward, 1994).

Pouca atenção é dada aos cuidados necessários para evitar perdas durante o processamento e armazenamento de ração, que pode ser bastante limitado (6–8 semanas) para vitaminas hidrossolúveis e um pouco mais para as lipossolúveis vitaminas A, D_3 e E.

As vitaminas hidrossolúveis do complexo B atuam como ativadores de enzimas e têm importante papel no metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos. Estudo extensivo foi realizado para avaliar o papel do ácido fólico, riboflavina e ácido pantotênico e sugere que os níveis recomendados pelo NRC (1981) para o crescimento ótimo, também é adequado para a função imune (Leith & Kaattari, 1989).

A vitamina C ou ácido ascórbico, também hidrossolúvel, é essencial para formação de colágeno, hematopoiese, desintoxicação de compostos, bem como de funções metabólicas, como o sistema antioxidante. Recentemente, muitos estudos têm sido realizados para determinar o papel da vitamina C no sistema imune e na resistência a doenças em peixes. Altas doses de vitamina C aumentam a resistência a algumas bactérias e alguns patógenos em peixes (revisado por Waagbo, 1997; Verlhac & Gabaudan, 1997). Também foi demonstrado que a vitamina C é capaz de reduzir os efeitos deletérios de estresse ambiental ou de manejo na saúde dos animais. Consequentemente, peixes alimentados com dietas pobres em vitamina C são mais susceptíveis ao estresse causado por alterações na qualidade da água,

tais como amônia e hipóxia (Henrique et al., 1998) e às doenças infecciosas e parasitárias (Moraes & Moraes, 2009). Hilton (1989) e Wise et al. (1988) demonstraram que peixes alimentados com dietas com níveis de vitamina C superiores a 300 mg/kg são menos afetados pelos efeitos tóxicos do cobre e nitrito.

A vitamina A e outras vitaminas lipossolúveis também estão envolvidas no metabolismo celular. A vitamina E, por exemplo, ou ɑ-tocoferol (ɑ-T) faz parte das defesas antioxidantes e tem função de proteção de membranas biológicas e lipoproteínas contra oxidação, sendo por esta razão administrada na dieta de animais em cultivo, já que estão sujeitos a diversas situações de estresse. Devlin (1997) ressaltou que, devido ao caráter lipofílico, a vitamina E acumula em membranas celulares e depósitos de gordura, onde reage rapidamente com as espécies reativas de oxigênio, ou radicais livres (ERO), atuando como removedor desses compostos e protegendo os ácidos graxos insaturados de reações de peroxidação. As membranas de peixes são ricas em ácidos graxos poliinsaturados n-3 (PUFA), o que pode resultar em maior requerimento de ɑ-T (Watanabe et al., 1981; Cowey et al., 1983; Stéphan et al., 1995). O nível e estado de oxidação dos PUFA na dieta, assim como a presença de outros antioxidantes como o selênio, podem alterar a necessidade de vitamina E na dieta dos peixes (Lovell et al., 1984; Gatlin & Wilson, 1986; Bai & Lee, 1998).

A redução na ingestão da vitamina E reduz o hematócrito e aumenta a fragilidade dos eritrócitos, os quais são sinais de perda da estabilidade das membranas causada pela ação dos radicais livres sobre elas. A ausência de vitamina E pode gerar distrofia muscular, degeneração de gorduras do fígado, anemia, hemólise eritrocitária, hemorragias e despigmentação. Sendo assim, a adição de vitamina E às dietas pode contribuir para evitar danos oxidativos nas células sanguíneas e em músculos congelados, aumentando assim a estabilidade oxidativa dos filés de peixe (Poston et al., 1976; Cowey et al., 1983; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1993; He & Lawrence, 1993). Além disso, a vitamina E é capaz de reduzir a formação de compostos derivados da oxidação das membranas de fígado e músculo post-mortem, aumentando o tempo de armazenagem dos filés (Stéphan et al., 1995). A vitamina E também é importante na resposta imune, pois aumenta a atividade de macrófagos e do sistema complemento e a produção de superóxido gerado por neutrófilos em atividade em peixes (Wise et al., 1993; Montero et al., 2001; Belo et al., 2005). Além disso, a suplementação com essa vitamina aumenta a capacidade dos peixes em curar feridas (Moraes & Moraes, 2009).

Para se determinar os níveis ideais de cada nutriente podem ser utilizados diversos parâmetros, tais como: conversão alimentar, crescimento dos animais e parâmetros bioquímicos de avaliação de oxidação dos filés e outros tecidos.

O requerimento ideal de vitamina E, assim como de outros nutrientes é bastante variável. Estudos mostram que, para peixes e crustáceos, em geral de zonas temperadas, o requerimento ideal pode variar de 20 a 100 mg/kg de alimento (Harlioglu & Barim, 2004) ou mais, dependendo da espécie de peixe. Em truta arco-íris O*ncorhynchus mykiss*, por exemplo, as concentrações ideais de vitamina E variam de 20 a 50 mg/kg de ração, dependendo de diversos fatores, como tamanho e idade dos animais e do parâmetro utilizado na análise, que foram o crescimento e peroxidação de

membranas (Cowey et al., 1983; Bell & Cowey, 1985). Concentrações elevadas de α-T no bagre africano *Clarias gariepinus* (Baker & Davies, 1996, 1997; Ng et al., 2004) e em outras espécies de peixes como em truta arco-íris (Chaiyapechara et al., 2003), aumentam a estabilidade dos filés de peixes, reduzindo sua oxidação e melhorando o sabor (Gatlin et al., 1992; Ruff et al., 2002). A peroxidação das membranas é um parâmetro relevante a ser avaliado, uma vez que são importantes para a manutenção da atividade muscular desses animais e, conseqüentemente, da qualidade dos filés.

Vijayavel et al. (2006) observaram diminuição do acúmulo de cobre nos tecidos de *Terapon jarbua* após suplementação da dieta com as vitaminas C e E, além de melhora de alguns parâmetros oxidativos, inclusive no músculo desses animais.

A maioria das dietas comerciais contém de 150 a 400 mg de vitamina E/kg de dieta, que parece adequado para manutenção do sistema imune em salmonídeos e bagre. Quando as dietas não são estabilizadas com antioxidantes, as altas concentrações de PUFA e pró-oxidantes (cobre, ferro etc.) podem aumentar o requerimento de vitamina E na dieta para proteção da função imune. Em pirarucu *A. gigas,* dieta com vitamina E não resultou em incremento do sistema imune, mas quando associada à vitamina C, este incremente ocorreu (Menezes et al., 2006).

Ainda há escassez de estudos realizados com suplementação da dieta de peixes tropicais, por isso torna-se necessário avaliar sua eficácia em animais de nossa fauna. Menezes et al. (2006) observaram em pirarucu *Arapaimas gigas* um aumento no crescimento e sobrevivência após suplementação da dieta com vitaminas C e E. Apesar de incremento em diversos fatores indicativos de melhoria na saúde dos animais, apenas a vitamina C foi capaz de aumentar a capacidade de resposta e do seu sistema imune. Santos (2006) observou que a vitamina E não aumentou o crescimento de matrinxã *B. amazonicus*, porém aumentou o hematócrito desses animais quando associada à vitamina C, como também foi observado em pirarucu (Menezes et al., 2006). Essas divergências podem ter sido geradas por diferenças no tempo de tratamento dos animais, nas concentrações da vitamina e das espécies estudadas.

Alguns estudos (Huang et al., 2004; Santos, 2006) mostraram que muitos peixes não alteram seu crescimento quando suplementados com diferentes concentrações de vitamina E na dieta. Contudo, é importante ressaltar que esta vitamina pode melhorar o sistema imune dos peixes, quando na piscicultura (Moraes & Moraes, 2009). Portanto, deve compor a dieta de qualquer espécie na piscicultura, mas este requerimento poderá variar de acordo com a espécie de peixe.

Dessa forma, além de ensaios imunológicos, ensaios de peroxidação são bastante eficientes também para se determinar o requerimento e o “status” de vitamina E em várias espécies (Poston et al., 1976; Cowey et al., 1983). Assim, dentre os parâmetros oxidativos, a utilização da peroxidação de membranas tem se mostrado bastante eficiente para se determinar a ingestão ideal de α-tocoferol na dieta (Poston et al., 1976; Bai & Gatlin, 1983; Stéphan et al., 1993; Montero et al., 2001) e a eficácia de determinada concentração de vitamina E na dieta em aumentar a estabilidade oxidativa das membranas.

Minerais

Peixes, assim como outros animais, necessitam de fontes de minerais que utilizam para manutenção da estrutura, osmorregulação e como co-fatores em diversas reações metabólicas. As dietas de salmões e trutas são suplementadas com alguns microelementos essenciais (cobre/ Cu, manganês/Mn, selênio/Se e zinco/Zn) a fim de garantir que o peixe receba quantidades suficientes destes, já que sua biodisponibilidade é reduzida pela complexação com outros componentes da ração (farinha de osso) (Lovell, 2002).

O selênio é um mineral essencial para o bom funcionamento dos organismos, sendo componente da enzima glutationa peroxidase. Lin & Shiau (2007) observaram em garoupa-malabar *Epinephelus malabaricus* uma interação entre o selênio e o cobre em excesso na dieta. Nesse estudo foi observada redução de ganho de peso após intoxicação com excesso de cobre na dieta e reversão desse efeito pela suplementação com selênio.

O ferro é um nutriente essencial para peixes e sua deficiência causa anemia microcítica em algumas espécies (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1993). A deficiência de ferro não é um problema em sistemas aquáticos, uma vez que a água e os ingredientes das dietas suprem as quantidades de ferro requeridas para as necessidades fisiológicas dos peixes. Por isso, em geral, as dietas comerciais apresentam de 150-800 mg de ferro/kg (Lall, 2002).

Apesar de muitos trabalhos mostrarem os efeitos deletérios do cobre em excesso na dieta e na água, suplementos alimentares com cobre já têm sido utilizados para tratamento de anemia em animais (Hart et al., 1928; Sampaio et al., 2008). O cobre é reconhecido como nutriente essencial tanto para hematopoiese, quanto para o e funcionamento de algumas enzimas envolvidas em vários processos biológicos necessários para o desenvolvimento. A dopamina hidroxilase, a citocromo oxidase (papel vital na respiração celular apresenta dois íons cobre em sua estrutura) e a CuZn-SOD (Lehninger, 1975; Bloomer & Lee, 1978; Weser et al., 1979; Moore & Ramamoorthy, 1984; Torres et al., 1987; McCord, 2000; Gaetke & Chow, 2003) apresentam como componentes o cobre e o zinco (Bell & Cowey, 1985). A deficiência de cobre pode reduzir a atividade da ceruloplasmina, catalase e SOD (Paynter et al., 1979; Taylor et al., 1988; Sukalski et al., 1997; Pan & Loo, 2000), que são componentes do sistema de defesa antioxidante, sendo que suas reduzidas atividades podem gerar estresse nos animais.

O cobre, na dieta, auxilia no processo de absorção do ferro pelo trato gastro-intestinal e também no transporte do ferro para dentro da célula, assim sendo, ele é um elemento importante no processo de formação da hemoglobina e função do eritrócito (Clearwater et al., 2000). Dessa forma, o cobre auxiliaria no metabolismo do ferro, pois Hart et al. (1928) mostraram a eficácia do cobre no tratamento de anemia em animais. Além disso, foi observado que a suplementação da dieta somente com o ferro não é tão eficiente quanto a associação cobre/ferro (Osaki et al., 1966; Pyatskowit & Prohaska, 2008), tanto no tratamento da anemia como no restabelecimento dos níveis de hemoglobina (Waddell et al., 1927). No entanto, o cobre também pode colaborar para o aumento da peroxidação das membranas

(Baker et al., 1998), o que pode gerar alteração no hematócrito e hemoglobina em ratos (Gatlin & Wilson, 1986; Lai et al., 1996).

Estudos nutricionais sobre o requerimento de cobre na dieta em espécies de peixes tropicais são escassos. Alguns trabalhos mostraram que o crescimento de peixes pode ser reduzido em concentrações superiores a 16-40 mg de Cu/kg na ração para o bagre do canal–alimentado durante 16 e 13 semanas; em concentrações acima de 35 mg de Cu/kg para o salmão do Atlântico *Salmo salar*; em concentrações de 125 mg de Cu/kg para o *Sebastes schlegeli* e em concentrações de 730 mg de Cu/kg para truta arco-íris *O. mykiss* (Murai et al., 1981; Gatlin & Wilson, 1986; Watanabe et al., 1997; Kim & Kang, 2004). Portanto, estes estudos mostram que a determinação do requerimento de cobre para uma determinada espécie pode variar em função de sua sensibilidade a este metal e o tempo de tratamento, alterando a resposta do peixe quanto ao crescimento e conversão alimentar. Contudo, o requerimento de cobre também pode ser influenciado pela presença de outros nutrientes tais como as vitaminas C e E, e micro nutrientes tais como o Zn e Se (Gaetke & Chow, 2003).

Agentes estressores e dieta - Tensão de oxigênio

As águas tropicais são caracterizadas por temperaturas altas com pouca variação anual e pelo conteúdo elevado e estável de matéria orgânica, o que favorece a proliferação de microrganismos, podendo resultar em hipóxia ou mesmo anóxia, como resultado da respiração de animais e plantas. Por isso, a hipóxia é considerada uma situação comum para os organismos aquáticos habitantes da bacia Amazônica, principalmente os peixes. Tais variações na concentração de oxigênio (O_2) dissolvido na água (OD) estão diretamente relacionadas ao denominado "pulso de inundações" que ocorre anualmente nesta região (Junk et al., 1983). Porém, as espécies amazônicas estão adaptadas a essas variações sazonais de oxigênio na água (Almeida-Val et al., 1995, 1999). Mas em cultivo, a diminuição na tensão de oxigênio na água pode ocorrer devido à grande densidade de animais em tanques, concentração elevada de matéria orgânica ou também durante o processo de limpeza desses tanques, afetando o "status" fisiológico dos peixes, e alterando assim o metabolismo e o requerimento de nutrientes essenciais desses animais.

Diversos autores têm mostrado que a hipóxia pode reduzir o crescimento dos animais devido à menor ingestão de alimento e de seu aproveitamento (Chabot & Dutil, 1999; Wilhelm Filho et al., 2005). Dessa forma, a quantidade de oxigênio dissolvido e os nutrientes disponíveis na dieta são fatores importantes para a manutenção dos peixes em cultivo intensivo. Consequentemente, os ajustes fisiológicos (bioquímicos e hematológicos) e adaptativos usados pelos peixes para enfrentar condições adversas são vitais para a sua sobrevivência e, em parte, para um crescimento adequado. Dentre as adaptações dos peixes para tolerar as variações diárias ou sazonais da quantidade de oxigênio dissolvido estão modificações comportamentais (respiração aquática de superfície - ASR), morfológicas (respiração aérea, distensão dos lábios), fisiológicas (depressão metabólica e ajustes na transferência de O_2) e bioquímicas que vão desde a depressão metabólica (Almeida-Val et al., 1993) até a alternância entre o

metabolismo aeróbico e anaeróbico, utilizando vias oxidativas e anaeróbicas (Almeida-Val et al., 1995; Almeida-Val et al., 1999).

As respostas fisiológicas à redução nos níveis de oxigênio podem ocorrer por cinco vias: (1) aumento da freqüência ventilatória, volume ventilatório e redução na frequência cardíaca; (2) aumento no número de eritrócitos circulantes, concentração de hemoglobina [Hb] e hematócrito; (3) aumento da afinidade da Hb pelo oxigênio, ajustando a proporção de fosfatos orgânicos (NTP) e [Hb]; (4) múltiplas hemoglobinas com diferentes propriedades funcionais ou (5) depressão do metabolismo (Hochachka & Somero, 1984; Wootonm, 1990; Val, 1996). Esses ajustes implicam em maior gasto de energia, que é obtida a partir da dieta e de reservas, como glicogênio, proteínas e lipídios, presentes em tecidos como fígado e músculo dos peixes.

Agentes estressores e dietas - Poluentes

O crescimento de um organismo é muitas vezes utilizado como um critério de avaliação em estudos crônicos de toxicologia. Isso porque níveis subletais de determinados compostos tóxicos induzem redução no crescimento de larvas ou juvenis de peixes (para mais detalhes veja Woltering, 1984; DeBoeck et al., 1997). Este baixo crescimento pode ser causado por redução na ingestão alimentar, mas também pelo aumento do gasto energético solicitado pelos processos de desintoxicação e manutenção das funções normais do organismo.

Em tanques de pisciculturas, o cobre é regularmente utilizado na forma de sulfato de cobre ($CuSO_4$) como agente terapêutico e no controle de algas e macrófitas, em concentrações próximas a 0,5 e 2,0 mg/L^{-1} (Boyd & Massaut, 1999). Exposição a concentrações subletais de cobre reduz o apetite bem como o crescimento em diferentes espécies de peixes (Drummond et al., 1973; Benoit, 1975; Lett et al., 1976; Buckley et al., 1982). DeBoeck et al. (1997) observaram diminuição no crescimento de carpas após uma semana de exposição a concentrações subletais de cobre. Nas concentrações menores de cobre (0,2 µM) os animais voltaram aos níveis de crescimento próximos ao grupo não exposto ao cobre apenas após três semanas. Porém, ocorreu um aumento na sua ingestão alimentar, o que indica maior gasto energético desses animais para desintoxicação. Marr et al. (1996) observaram em truta arco-íris diminuição no crescimento e no consumo alimentar após exposição a concentrações subletais de cobre e zinco na água. Resultados, similares foram descritos por Santos et al. (2000) em camarão após 35 dias de exposição.

Kamunde et al. (2002) observaram interação entre a concentração de cobre na dieta e na água, influenciando a conversão alimentar e o ganho de peso em trutas arco-íris. As trutas mantidas em água sem cobre e com reduzida concentração de cobre na dieta apresentaram redução desses dois parâmetros em relação aos grupos mantidos nos níveis normais de cobre na dieta e na água. Porém, o excesso de cobre não foi capaz de reduzir o crescimento dos animais, apesar de seu aumentado acúmulo em diversos tecidos. Contudo, antes de ocorrer alterações no crescimento dos animais, modificações na composição bioquímica foram aparentes, como a utilização de estoques de energia (glicogênio e gordura) e a diminuição da síntese

protéica, o que pode alterar o requerimento de outros nutrientes na dieta. Portanto, só o crescimento não pode ser utilizado como fator de avaliação de toxicidade em peixes.

Alguns nutrientes são conhecidos por serem redutores dos efeitos do cobre na dieta e na água e outros metais por seus efeitos ao induzir o estresse oxidativo nos tecidos, dentre eles estão a vitamina E, o beta-caroteno, o ácido alfa-lipóico e os polifenóis (Gaetke & Chow, 2003). A vitamina C é um importante antioxidante, atuando como agente redutor e doando elétrons a outras moléculas redutoras como a enzima glutationa redutase, que reduz a glutationa, responsável pela redução de diversos compostos. A vitamina C ainda é responsável pela doação de elétrons a metais como ferro e cobre, que podem também catalisar a oxidação da vitamina C. Dessa forma, a associação entre vitamina C e metais de transição como Cu e Fe pode gerar capacidade antioxidante ou pró-oxidante da vitamina C, já que, em altas concentrações esta vitamina tende a ser antioxidante e em baixas concentrações tende a ser pró-oxidante (Gaetke & Chow, 2003).

Considerações finais

Portanto, os conhecimentos básicos sobre as dietas são essenciais e de grande relevância para a produção de peixes em fazendas de criação, pois dietas formuladas inadequadamente podem afetar toda uma produção, devido a influencia negativa no crescimento e na saúde dos peixes cultivados, a exemplo do que ocorre com outros organismos aquáticos.

Referências

ALMEIDA-VAL, V. M. F.; FARIAS, I. P.; SILVA, M. N. P.; DUNCAN, W. P.; VAL, A. L. 1995. Biochemical adjustments to hypoxia by Amazon cichlids. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28:1257-1263.

ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L.; HOCHACHKA, P. W. 1993. Hypoxia tolerance in Amazon fishes: status of na under-explored "goldmine". In: HOCHACHKA, P. W.; LUTZ, P. L.; SICK, T.; ROSENTHAL, M.; VAN DEN THILLART, G. (Ed.). *Surviving Hypoxia: Mechanisms of control and adaptation*. Boca Raton: CRC Press, p.435-445.

ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L.; WALKER, I. 1999. Long-term and short-term adaptation to varyng oxygen levels: intra-specific phenotypic plasticity and interspecific variation. In: VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. (Ed.). *Biology of Tropical Fishes*. Manaus: INPA, p.185-206.

BAI, S. C.; GATLIN, D. M.III. 1983. Dietary vitamin E concentration and duration of feeding affect tissue ɑ-tocopherol concentrations of channel catfish (Ictalurus puctatus). *Aquaculture*, 113:129-135.

BAI, S. C.; LEE, K. J. 1998. Different levels of dietary DL-ɑ-tocopheryl acetate affect the vitamin E status of juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Aquaculture*, 161:405-414.

BAKER, R. T. M.; DAVIES, S. J. 1996. Changes in tissue a-tocopherol status and degree of lipid peroxidation with varying ɑ-tocopherol acetate inclusion in diets for the African catfish. *Aquacult. Nutr.*, 2:71-79.

BAKER, R. T. M.; DAVIES, S. J. 1997. The quantitative requirement for α-tocopherol by juvenile African catfish, *Clarias gariepinus Burchell. Anim. Sci.*, 65:135-142.

BAKER, R. T. M.; HANDY, R. D.; DAVIES, S. J.; SNOOK, J. C. 1998. Chronic dietary exposure to copper affects growth, tissue lipid peroxidation, and metal composition of the gray mullet, *Chelon labrosus*. *Mar. Environ. Res.*, 45:357-365.

BELL, J. G.; COWEY, C. B. 1985. Vitamin E and selenium in fatty acid oxidation. In: COWEY, C. B.; MACKIE, A. M.; BELL, J. G. (Ed.). *Nutrition and Feeding in Fish*. Aberdeen: Acad. Press, p. 333-347.

BELO, M. A. A.; SCHALCH, S. H. C.; MORAES, F. R.; SOARES, V. E.; OTOBONI, A. M. M. B.; MORAES, J. E. R. 2005. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicu*s. *J. Comp. Path.*, 133:146-154.

BENOIT, D. A. 1975. Chronic effects of copper on survival, growth, and reproduction of the bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 2:353–358.

BLOOMER, L. C.; LEE, G. R. 1978. Normal hepatic copper metabolism. In: POWELL, L. W. (Ed.). *Metals and the Liver*. New York: Marcel Decker, p. 179-239.

BORBA, M. R.; FRACALOSSI, D. M.; PEZZATO, L. E.; MENOYO, D.; BAUTISTA, J. M. 2003. Growth, lipogenesis and body composition of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) fingerlings fed different dietary protein and lipid concentrations. *Aquatic Living Res.*, 16:362–369.

BOYD, C. E.; MASSAUT, L. 1999. Risk associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquacult. Engineer*, 20:113-132.

BUCKLEY, J. T.; ROCH, M.; MCCARTER, J. A.; RENDELL, C. A.; MATHESON, A. T. 1982. Chronic exposure of coho salmon to subletal concentrations of copper: I. Effects on growth, on accumulation and distribution of copper, and on copper tolerance. *Comp. Biochem. Physiol.*, 72C:15–19.

CARVALHO, C. S.; FERNANDES, M. N. 2006. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture*, 251:109-117.

CHABOT, D.; DUTIL, J.-D. 1999. Reduced growth of Atlantic cod in non-lethal hypoxic conditions. *J. Fish Biol.*, 55:472-491.

CHAIYAPECHARA, S.; CASTEN, M. T.; HARDY, R. W.; DONG, F. M. 2003. Fish performance, fillet characteristics, and health assessment index of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing adequate and high concentrations of lipid and vitamin E. *Aquaculture*, 219:715-738.

CLEARWATER, S. J.; BASKIN, S. J.; WOOD, C. M.; MCDONALD, D. G. 2000. Gastrointestinal uptake and distribution of copper in rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, 203:2455–2466.

COWEY, C. B.; ADRON, J. W.; YOUNGSON, A. 1983. The vitamin requirement of rainbow trout (Salmo gairdneri) given diets containing polynsaturated fatty acids derived from fish oil. *Aquaculture*, 30:85-93.

DABROWSKI, K.; GUDERLEY, H. 2002. *Intermediary Metabolism*. *Fish Nutrition.* 3rd Edition. Elsevier Science, p.309.

DE BOECK, G.; VLAEMINCK, A.; BLUST, R. 1997. Effects of Sublethal Copper Exposure on Copper Accumulation, Food Consumption, Growth, Energy

Stores, and Nucleic Acid Content in Common Carp. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 33:415–422.
DEVLIN, T. M. 1997. *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas*. 4th ed. São Paulo:Edgard Blucher.
DRUMMOND, R. A.; SPOOR, W. A.; OLSON, G. F. 1973. Some short-term indicators of sublethal effects of copper on brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *J. Fish Res. Board. Can.*, 30:698–701.
FRASCÁ-SCORVO, C. M.; CARNEIRO, D. J.; MALHEIROS, E. B. 2001. Comportamento alimentar do matrinxã (*Brycon cephalus*) no período de temperaturas mais baixas. *Bol. Inst. Pesca*, 27:1-5.
GAETKE, L. M.; CHOW, C. K. 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicol.*, 189:147-163.
GATLIN, D.M.; WILSON, R. P. 1986. Dietary copper requirements of fingerling channel catfish. *Aquaculture*, 54:277-285.
GATLIN, D. M. III.; BAI, S. C.; ERICKSON, M. C. 1992. Effects of dietary vitamin E and synthetic antioxidants on composition and storage quality of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 106:323-332.
HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. 1993. Lipid-peroxidation—its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57:S715–S725.
HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. 1989. *Free Radical Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press, p. 85.
HAMRE, K.; CHRISTIANSEN, R.; WAAGBO, R.; MAAGE, A.; TORSTENSEN, B. E.; LYGREN, B.; LIE, O.; WATHNE, E.; ALBREKTSEN, S. 2004. Anti-oxidant vitamins, minerals and lipid levels in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.): effects on growth performance and fillet quality. *Aquac. Nutr.*, 10:113–123.
HAMRE, K.; KOLAS, K.; SANDNES, K.; JULSHAMN, K.; KIESSLING, A. 2001. Feed intake and absorption of lipid oxidation products in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets coated with oxidised fish oil. *Fish Physiol. Biochem.*, 25:209–219.
HARLIǑGLU, M. M.; BARIM, O. 2004. The effect of dietary vitamin E on the pleopodal egg and stage-1 juvenile numbers of freshwater crayfish *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). *Aquacult.*, 236:267-276.
HART, E. B.; STEENBOCK, J.; WADDELL, J.; ELVEHJEM, C. A. 1928. Iron nutrition. VII. Copper is a supplement to iron for hemoglobin building in the rat. *J. Biol. Chem.*, 77:797-812.
HE, H.; LAWRENCE, A. L. 1993. Vitamin requirement of *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 118:245-255.
HENRIQUE, M. M. F.; GOMES, E. F.; GOUILLOU-COUSTANS, M. F.; OLIVA-TELES, A.; DAVIES, S. J. 1998. Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 161:415-426.
HILTON, J. W. 1989. The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish. *Aquaculture*, 79:223-244.
HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. 1984. *Biochemical Adaptation*. New Jersey: Princeton University Press, p. 85-144.
HUANG, C. H.; HIGGS, D. A.; BALFRY, S. K.; DEVLIN, R. H. 2004. Effect of dietary vitamin E level on growth, tissue lipid peroxidation, and erythrocyte fragility of transgenic coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 139A:199-204.

JOBLING, M. 1994. *Fish Bioenergetics*. London, UK: Chapman & Hall.

JUNK, W. J.; SOARES, G. M.; CARVALHO, F. M. 1983. Distribution of fish species in a lake of the Amazon River floodplain near Manaus (lago Camaleão), with special reference to extreme hypoxia conditions. *Amazoniana*, 7:397.

KAMUNDE, C.; GROSELL, M.; HIGS; D.; WOOD, C. M. 2002. Copper metabolism in actively growing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): interactions between dietary copper exposure. *J.Exp. Biol.*, 205:279-290.

KIM, S.-G.; KANG, J.-C. 2004. Effect of dietary copper exposure on accumulation, growth and hematologival parameters of the juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Mar. Envir. Res.*, 58:65-82.

LAI, C.; HUANG, W.; KLEVAY, L. M.; GUNNING, W. T.; CHIU, T. H. 1996. Antioxidant enzyme gene transcription in copper-deficient rat liver. *Free Rad. Biol. Med.*, 21:233-240.

LALL, S. P. 2002. The Minerals. In: *Fish Nutrition*, Third Edition. Elsevier Science: USA.

LEHNINGER, A. L. 1975. *Biochemistry*. New York: Worth.

LEITH, D.; KAATARI, S. 1989. *Effects of vitamin nutrition on the immune response of hatchery-reared salmonids:* Final report. Portland, Oregon: U.S. Department of Energy, Bonneville Power Administration, Div. of Fish and Wildlife.

LETT, P. F.; FARMER, G.J.; BEAMISH, F.W.H. 1976. Effect of copper on some aspects of the bioenergetics of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Fish Res. Board. Can.*, 33:1335–1342.

LIN, Y.-H.; SHIAU, S.-Y. 2007. The effects of dietary selenium on the oxidative stress of grouper, *Epinephelus malabaricus*, fed high copper. *Aquaculture*, 267:38–43.

LOVELL, R. T. 2002. Diet and Fish Husbandry. In: *Fish Nutrition*. 3. ed. New York: Elsevier Science.

LOVELL, R. T.; MIYAZAKI, T.; RABEGNATOR, S. 1984. Requirements of α-tocopherol by channel catfish fed diets low in polyunsaturated triglycerides. *J. Nutr.*, 114:894-901.

MARR, J. C. A.; LIPTON, J.; CACELA, D.; HANSEN, J. A.; BERGMAN, H. L.; MEYER, J. S.; HOGSTRAND, C. 1996. Relationship between copper exposure duration, tissue copper concentration, and rainbow trout growth. *Aquatic Toxicol.,* 36:17–30.

MCCORD, J. M. 2000. The evolution of free radiclas and oxidative stres. *A. J. Med.*, 108:652-659.

MENEZES, G. C.; TAVARES-DIAS, M.; ONO, E. A.; ANDRADE, J. I. A.; BRASIL, E. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E. G. 2006. The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. *Comp. Biochem. Physiol.*, 145A:274–279.

MONTERO, D.; TORT, L.; ROBAINA, L.; VERGANA, J. M.; IZQUIERDO, M. S. 2001. Low vitamin E in diet reduces resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish Shelfish Immun.*, 11:473-790.

MOORE, J. W.; RAMAMOORTHY, S. 1984. Heavy metals in naturals waters. Berlim: Springer, p. 77-79.

MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. 2009. Nutracêuticos na inflamação e cicatrização e peixes de interesse zootécnico. In: TAVARES-DIAS, M.

(Org.). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá, p. 625-723.

MOURENTE, G.; DIAZ-SALVAGO, E.; BELL, J. G.; TOCHER, D. R. 2002. Increased activities of hepatic anti-oxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidised oil: attenuation by dietary vitamin E. *Aquaculture*, 214:343–361.

MURAI, T.; ANDREWS, J. W.; SMITH, R. G. JR. 1981. Effects of dietary copper on channel catfish. *Aquaculture*, 22:353-357.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1981. *Nutrient requirements of coldwater fishes*. Washington: National Academy of Sciences.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1993. *Nutrient requirements of fish*. Washington: National Academy of Sciences.

NG, W.-K.; WANG, Y.; KETCHIMENIN, P.; YUEN, K.-H. 2004. Replacement of dietary fish oil with palm fatty acid distillate elevates tocopherol and tocotrienol concentrations and increases oxidative stability in the muscle of African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*, 233:423-437.

OBA, E. T. 2006. *Efeitos do exercício físico moderado e da suplementação da dieta com vitamina C no crescimento e no metabolismo de matrinxã, Brycon cephalus (Günther, 1869) (Teleostei: Characidae).* 99 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

OSAKI, S.; JOHNSON, D. A.; FRIEDEN, E. 1966. The possible significance of ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum. *J. Biol. Chem.*, 241:2746-2751.

PAN, Y.; LOO, G. 2000. Effect of copper deficiency on oxidative DNA damage in Jurkat T-lymphocytes. *Free Rad. Biol. Med.*, 28:824-830.

PAYNTER, D. I.; MOIR, R. J.; UNDERWOOD, E. J. 1979. Changes in activity of Cu-Zn superoxide dismutase enzyme in tissues of the rat with change in dietary copper. *J. Nutr.*, 109:1570-1576.

POSTON, H. A.; GERALD, F.; COMBS, J. R.; LEIBOVITZ, L. 1976. Vitamin E and selenium interrelations in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*): gross, histological and biochemical deficience signs. *J. Nutr.*, 106:892-904.

PYATSKOWIT, J. W.; PROHASKA, J. R. 2008. Copper deficient rats and mice both develop anemia but only rats have lower plasma and brain iron levels. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 147:316–323.

RUFF, N.; FITZGERALD, R. D.; CROSS, T. F.; KERRY, J. P. 2002. Fillet shelf-life of Atlantic halibut *Hippoglossus hipoglossus* L. fed elevated levels of α-tocopheryl acetate. *Aquacult. Res.*, 33:1059-1071.

SÁ, M. V.; FRACALOSSI, D. M. 2002. Exigência protéica e relação energia/proteína para alevinos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). *R. Brasil. Zootec.*, 31:1–10.

SAMPAIO, F. G.; BOIJINK, C. L.; OBA, E. T.; SANTOS, L. R. B.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T. 2008. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 147:43–51.

SANTOS, L. R. B. 2006. *Efeito da dieta suplementada com vitamina E e cobre nas respostas metabólicas e antioxidantes de matrinxã, Brycon cephalus (Günther, 1869), frente à hipóxia*. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

SANTOS, M. H. S.; CUNHA, N. T.; BIANCHINI, A. 2000. Effects of copper and zinc on growth, feeding and oxygen consumption of *Farfantepenaeus paulensis* postlarvae (Decapoda: Penaeidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 247:233-242.

SARGENT, J.; BELL, G.; MCEVOY, L.; TOCHER, D.; ESTEVEZ, A. 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, 177:191–199.

SARGENT, J. R.; TOCHER, D. R.; BELL, J. G. 2002. The lipids. In: HALVER, J. E.; HARDY, R. W. (Ed.). *Fish Nutrition*. Amsterdam: Academic Press, p. 181–257.

SCORVO-FILHO, J. D.; MARTINS, N. B.; AYROSA, L. M. S. 1998. Piscicultura em São Paulo: custos e retornos de diferentes sistemas de produção na safra de 1996/1997. *Inf. Econ.*, 28:41–60.

STEPHAN, G.; GUILLAUME, J.; LAMOUR, F. 1995. Lipid peroxidation in turbot (*Scophthalamus maximus*) tissue: Effect of dietary vitamin E and dietary n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture*, 130:251-268.

STÉPHAN, G.; GUILLAUME, J.; LAMOUR, F. 1995. Lipid peroxidation in turbot (*Scophthalamus maximus*) tissue: Effect of dietary vitamin E and dietary n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture*, 130:251-268.

SUKALSKI, K. A.; LABERGE, T. P.; JOHNSON, W. T. 1997. In vivo oxidative modification of erythrocyte membrane proteins in copper deficiency. *Free Rad. Biol. Med.*, 22:835-842.

SUTTON, J.; BALFRY, S.; HIGGS, D.; HUANG, C.; SKURA, B. 2006. Impact of iron-catalyzed dietary lipid peroxidation on growth performance, general health and flesh proximate and fatty acid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared in seawater. *Aquaculture*, 257:534-557.

TACON, A. G. J. 1996. Lipid nutritional pathology in farmed fish. *Arch. Anim. Nutr-Arch. Tierernähr.*, 49:33–39.

TAKEUCHI, T.; WATANABE, T.; NOSE, T. 1979. Requirement for essential fatty acids of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in freshwater environment. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 45:1319–1323.

TAYLOR, C. G.; BETTGER, W. J.; BRAY, T. M. 1988. Effect of dietary zinc or copper deficiency on the primary free radical defense system in rats. *J. Nutr.*, 118:613-621.

TORRES, P.; TORT, L.; FLOS, R. 1987. Acute toxicity of copper to Mediterranean dofish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86:169-177.

VAL, A. L. 1996. Surviving low oxygen levels: lessons from fishes of the Amazon. In: VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; RANDALL, D. J. (Ed.). *Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon*. Manaus: INPA, p.59-73.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. 1997. *The effect of vitamin C on Fish Health*. Switzerland: Roche Technical Bulletin.

VIJAYAVEL, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; THILAGAM, H.; BALASUBRAMANIAN, M. P. 2006. Dietary ascorbic acid and α-tocopherol mitigates oxidative stress induced by copper in the thornfish *Terapon jarbua*. *Science Total Environ.,* 372:157–163.

WAAGBO, R. 1997. The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: A review. *Aquac. Fish. Manag.*, 25:175-197.

WADDELL, J.; STEENBOCK, H.; ELVEHJEM, C. A.; HART, E. B. 1927. Iron in nutrition V. Iron salts and iron-containing ash extracts in the correction of anemia. *J. Biol. Chem.*, 77:777-795.

WATANABE, T.; KIRON, V.; SATOH, S. 1997. Trace minerals in fish nutrition. *Aquacult.*, 151:185-207.

WATANABE, T.; TAKEUCHI, T.; MATSUI, M.; OGINO, C.; KAWABATA, T. 1981. The relationship between dietary lipid levels and α-tocopherol requirement of rainbow trout. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 47:1463-1471.

WEBER, J. M.; ZWINGESLTEIN, G. 1995. Circulatory substrate fluxes and their regulation. In: HOCHACHKA, P.W. & MOMMSEN, T.P. (eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Amsterdan: Eselvier Science Publishers, 4: 15-32.

WESER, U.; SCHUBOFZ, L. M.; YOUNES, M. 1979. Chemistry of copper proteins and enzymes. In: NRIAGU, J. O. (Ed.). *Copper in the Environment. II. Health Effects.* New York: Willey, p.197-232.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M. A.; ZANIBONI-FILHO, E.; PEDROSA, R. C. 2005. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). *Aquacult.*, 244:349-357.

WISE, D. J.; TOMASSO, J. R.; BRANDT, T. M. 1988. Ascorbic acid inhibition of nitrite-induced methemoglobinaemia in channel catfish. *Prog. Fish Cult.*, 50:77-80.

WISE, D. J.; TOMASSO, J. R.; GATLIN, D. M.; BAI, S. C.; BLAZER, V. S. J. 1993. Effects of dietary selenim and vitmain E on red blood cell peroxidation, glutathione peroxidase activity, and macrophage superoxide anion production in channel catfish. *Aquat. Anim. Health.*, 5:177.

WOLTERING, D. M. 1984. The growth response in fish chronic and early life stage toxicity tests: a critical review. *Aquat. Toxicol*., 5:1–21.

WOODWARD, W. 1994. Dietary vitamin requirements of cultured young fish, with emphasis on quantitative estimates for salmonids. *Aquaculture*, 124:133-168.

WOOTONM, R. J. 1990. *Ecology of Teleost Fishes*. New York: Chapman and Hall.

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 6

Homeopatia populacional em tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus*

Lauro Vargas & Ricardo Pereira Ribeiro

Resumo
A produção mundial de tilápias, principalmente tilápia do Nilo Oreochromis niloticus, poderá atingir 3,5 milhões de toneladas no ano 2010. Há poucos artigos científicos utilizando a homeopatia em organismos aquáticos. O presente capítulo analisa estudos sobre a utilização da homeopatia populacional em tilápias do Nilo.

Abstract
World tilapia production, especially the Nile tilapia Oreochromis niloticus, may reach 3.5 million tons in 2010. Few scientific papers are extant on homeopathy in water organisms. Current chapter investigates research on the use of population homeopathy in Nile tilapias.

Introdução

A produção mundial de tilápias, principalmente tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, poderá atingir 3,5 milhões de toneladas no ano 2010. América do Sul e África tiveram um aumento substancial na produção de tilápias durante a década passada e espera-se um crescimento forte da América Latina nos próximos anos (Josupeit, 2007).

A tilápia possui vários atributos que a caracterizam como um candidato ideal para a aquicultura, especialmente em países em vias de desenvolvimento. Estes atributos incluem: crescimento rápido, tolerância a uma grande variedade de condições ambientais, resistência ao estresse e doenças, capacidade de reprodução em cativeiro, tempo curto de cada geração, alimentação em níveis tróficos baixos e aceitação de alimentos artificiais logo após a absorção do saco vitelino (El-Sayed, 2006).

O pai da medicina moderna, Hipócrates (460-370 aC), registrou entre seus aforismos a seguinte frase: *"... a doença é produzida pelos semelhantes e graças aos semelhantes que se administra ao paciente, esse evolui da doença para a saúde ..."* e segue ... *"a febre é suprimida pelo que a provoca e produzida pelo que a suprime"* (Maury, 2002).

A palavra homeopatia tem origem no grego: *homeos* = semelhante; *pathos* = moléstia, foi criada por Samuel Hahnemann (1755-1843) na Alemanha e divulgada através da publicação de suas bases e princípios no livro *Organon da arte de curar*, em 1810 (Benez et al., 2004).

A homeopatia é uma ciência baseada na arte médica, que tem como finalidade dar ao indivíduo condições físicas e mentais para alcançar livremente os seus mais altos desígnios, através de leis e princípios determinados, segundo técnica e artes próprias (Benites, 2002).

A homeopatia está baseada no princípio dos semelhantes, os medicamentos curam as doenças cujo conjunto sintomático se assemelha ao conjunto de seus efeitos fisiológicos ou farmacodinâmicos no organismo sadio, princípio evidenciado por Hipócrates, experimentalmente confirmado por Samuel Hahnemann e posto em prática por inúmeros clínicos até a atualidade (Maury, 2002).

De acordo com Hahnemann (1810), em seus primeiros relatos publicados no livro *Organon da arte de curar*, para se obter sucesso no restabelecimento de uma enfermidade, é necessário administrar um princípio medicamentoso que produza no organismo sadio os sintomas da moléstia que se quer tratar (Hahnemann, 2001).

Os medicamentos homeopáticos podem ser elaborados de matérias-primas de origem vegetal, animal e mineral, as quais são solubilizadas em água e álcool. As diluições são obtidas em três escalas, as Hahnemanianas que são: centesimal (C ou CH) e cinqüenta milesimal (LM) e as de Hering: decimal (D, X ou DH). Após cada diluição o medicamento sofre um processo de sucussão (agitação vigorosa), podendo ser manual ou mecânico (equipamento) e, a cada 100 sucussões, obter-se uma potência superior, sendo este o processo de dinamização dos medicamentos homeopáticos (Benites, 2002).

Para compreender o efeito terapêutico da baixa diluição é preciso admitir que, além de certo limiar, encontra-se em presença de uma manifestação que se deve atribuir a uma ação medicamentosa mais qualitativa do que quantitativa e que vai de encontro à doença em questão. A utilização dos medicamentos homeopáticos com sucesso em crianças com pouca idade e em animais, pode afastar a possibilidade de um possível efeito devido à sugestão do paciente. Quando corretamente utilizado, o fármaco homeopático não ocasiona choque terapêutico devido à intoxicação medicamentosa e não leva a uma saturação do organismo, o que auxilia ao não estabelecimento da resistência medicamentosa (Maury, 2002).

Khuda-Bukhsh (2003), ao se referir aos resultados de seus experimentos com a utilização de produtos em altas diluições, com regulação de expressão gênica, avaliados pelo conteúdo de proteínas, enzimas, DNA e RNA, sugeriu que o principal mecanismo de ação destes está na regulação da expressão de alguns genes específicos em determinadas circunstâncias, mecanismo este que pode nortear as respostas biológicas aos produtos homeopáticos.

A utilização da homeopatia em animais data da época em que foi testada por Hahnemann em eqüinos e por Guilherme Lux (1773-1849), trabalhando com medicamentos dinamizados. No Brasil, a partir da década de 1970, a Homeopatia foi elevada à categoria de especialidade médica e a partir do ano 2000 foi reconhecida como especialidade pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (Souza, 2002).

Os medicamentos homeopáticos não provocam danos aos animais, aos consumidores dos produtos de origem animal, nem ao meio ambiente, o qual é favorecido pelo menor uso de produtos químicos (Lopes, 2004).

A aplicação da homeopatia aos rebanhos constitui a **Homeopatia Populacional**. A Homeopatia Populacional tornou-se a medicina ideal para rebanhos devido ao seu custo reduzido, a sua eficácia, pela ausência de toxidez e por serem os princípios ativos extremamente diluídos, apresentando absoluta impossibilidade de deixarem resíduos na carne ou leite, sendo incapazes de prejudicar a saúde humana (Real, 2006).

Souza (2002) afirmou que a homeopatia como forma de terapia para rebanhos segue os mesmos passos do tratamento individual, uma vez que o mesmo deve ser encarado como um organismo único e apresenta vantagens como:

1) **Equilíbrio animal**, uma vez que a terapêutica confere aos animais uma redução do estresse, especialmente o de confinamento, e em conjunto com o manejo adequado colabora para o bem estar animal, influenciando diretamente na saúde destes e no desenvolvimento de suas potencialidades produtivas;
2) **Facilidade de administração** por via oral, adicionado à água, ração ou sal mineral, sendo menos invasivo, não necessitando de contenção, evitando-se assim possíveis traumatismos, possibilitando redução do estresse;
3) **Inexistência de resíduos**, motivo pelo qual pode ser utilizada em modelos orgânicos de produção;
4) **Ausência de contaminação ambiental**, pois o uso reduz a poluição ambiental, promovendo a preservação de suas potencialidades biológicas para o controle natural e equilibrado de pragas.

Há poucos estudos científicos utilizando a homeopatia em organismos aquáticos. Guedes et al. (2004) realizaram experimentos utilizando um bioterápico preparado à base de glândula tireóide de rãs e obtiveram alterações na taxa de metamorfose dos animais tratados, onde o número de animais que atingiram o estágio final da metamorfose foi significativamente menor do que o grupo controle que recebeu somente a solução hidroalcóolica.

Nas espécies de peixes que apresentam precocidade e facilidade de reprodução, como as tilápias, quando se utilizam apenas exemplares do mesmo sexo nos tanques, dificilmente há um desenvolvimento gonadal completo e a energia destinada para o crescimento das gônadas, pode ser quase que inteiramente destinada para o crescimento corporal (Baldisserotto, 2002).

Na reversão sexual de tilápias, o método tradicionalmente utilizado atualmente no Brasil, devido a sua maior praticidade e baixo custo, é a

incorporação de hormônios esteróides à ração. Este método apresenta inconvenientes, por exemplo: intensa mão-de-obra, longa manipulação direta dos hormônios pelos funcionários, resíduos ambientais e baixas taxas de sobrevivência dos peixes, por tornar-se um processo estressante aos mesmos (Ribeiro, 2001; Baldisserotto, 2002).

O músculo estriado nos peixes constitui aproximadamente 70% do seu peso corporal, tornando-o uma importante fonte protéica para a alimentação. O crescimento desse tecido ocorre por dois processos: aumento do diâmetro da fibra (hipertrofia) e aumento do número de fibras existentes (hiperplasia), através da atividade dos mioblastos indeferenciados (células satélites), que também estão envolvidos nos processos de reparação muscular em casos de lesão (Camargo et al., 2004).

As enfermidades, de modo geral, estão relacionadas às alterações do hemograma nos animais e no homem, por isso, o quadro hematológico de diferentes peixes e condições de criação vêm sendo estudados; a hematologia em peixes contribui para a compreensão da fisiologia, relação filogenética, condições alimentares e outros parâmetros ecológicos (Tavares-Dias & Moraes, 2004).

A existência de um apelo mundial pela preservação ambiental, aliado a uma consciência crescente da população sobre as conseqüências à saúde ocasionadas por uma alimentação com grande quantidade de resíduos tóxicos, tem impulsionado a busca por produtos de origem animal produzidos em ambientes com a menor interferência de produtos químicos artificiais (Benez et al., 2004).

No presente capítulo serão apresentados os principais resultados de trabalhos científicos desenvolvidos pelo Grupo de Pesquisa *PeixeGen* do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), com os núcleos homeopáticos *Homeopatila RS*® e *Homeopatila 100*® em tilápias do Nilo *(O. niloticus)*.

Homeopatila RS®

A - Desempenho, histologia de fígado e proporção sexual

Valentim-Zabott et al. (2008) avaliaram os efeitos do núcleo homeopático *Homeopatila RS*® no desempenho, histologia de fígado e proporção sexual de tilápias do Nilo *O. niloticus*. Utilizaram-se 12 caixas (500L), com densidade de 0,8 larvas/L, instaladas numa estufa durante 45 dias.

Foram utilizados três tratamentos: controle com álcool 30º GL (C); hormonal com 17 α-metiltestosterona (H) e homeopático com *Homeopatila RS*® em solução hidroalcóolica (HH), conforme a Tabela 1.

A ração dos diferentes tratamentos foi fornecida até 28 dias, após este período, os alevinos receberam ração não medicada por mais 17 dias. A composição do núcleo homeopático *Homeopatila RS*® encontra-se na Tabela 2.

O núcleo homeopático *Homeopatila RS*® foi elaborado pela empresa RealH, com *Iodium* (Iodo dinamizado), e os bioterápicos obtidos do extrato de gônadas masculinas de tilápias do Nilo e da hipófise de carpa.

Os valores médios da temperatura ambiente e da água, durante o período experimental, foram respectivamente de 30,53 ± 4,16ºC e 26,77 ± 2,81 ºC. Na Tabela 3, pode-se observar os parâmetros físico-químicos da água durante o período experimental, nos diferentes tratamentos.

Tabela 1.Tratamentos utilizados durante o período de diferenciação gonadal de póslarvas de tilápia do Nilo *O. niloticus*.

Tratamentos	Dose/kg de ração
(C) Álcool 30ºGL	50 mL
(H) 17 α-metiltestosterona	60 mg
(HH) *Homeopatila RS®* solução hidroalcóolica	50 mL

Tabela 2. Composição do núcleo homeopático *Homeopatila RS®*.

Compostos	Diluição
Iodium	10^{-24}
Extrato de hipófise de carpa	10^{-24}
Extrato de gônadas masculinas de tilápias do Nilo	10^{-60}

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos da água nos tratamentos. Valores expressam as médias ± desvio padrão.

Parâmetros	Tratamentos		
	C	H	HH
pH	6,76±0,43	6,57±0,41	6,63±0,29
Oxigênio dissolvido (mg/L^{-1})	6,71±0,33	6,76±0,40	6,53±0,35
Nitrito (ppm)	0,029±0,009	0,030±0,010	0,030±0,010
Amônia (mg/L)	0,85±0,37	0,81±0,32	0,79±0,29

C = controle; H = 17 α-metiltestosterona; HH = *Homeopatila RS®.*

Os valores médios de temperatura, pH, oxigênio dissolvido, amônia e nitrito da água das caixas, obtidos durante o período experimental, mantiveram-se dentro da faixa de relativo conforto para a espécie estudada, segundo Ribeiro (2001), evitando-se uma possível interferência da qualidade da água no desempenho e saúde dos animais.

Ao final do período experimental de 45 dias, os peixes permaneceram em jejum antecipado de 24h, para realizar os procedimentos de anestesia com benzocaína (Stoskopf, 1993), medição, pesagem, eutanásia por secção da medula espinhal cervical e acondicionamento no formol.

Foram determinados os valores médios de comprimento total inicial e final, peso final, índice hepatossomático, taxa de sobrevivência, biomassa total estimada, valores médios de alterações histológicas de fígado e brânquias e proporção sexual.

A análise dos dados revelou diferenças significativas ($p<0,05$) no comprimento total final, peso final, índice hepatossomático e sobrevivência (Tabela 4).

Tabela 4. Desempenho de tilápias do Nilo *O. niloticus*, submetidas aos diferentes tratamentos, no período de diferenciação gonadal. Valores expressam as médias ± desvio padrão.

Variáveis	Tratamentos		
	C (n= 160)	H (n= 160)	HH (n = 160)
CT inicial (cm)	0,82 ± 0,04	0,82 ± 0,04	0,82 ± 0,04
CT final (cm)	4,57 ± 0,69a	4,70 ± 0,44a	3,82 ± 0,60b
Peso final (g)	1,81 ± 0,84a	1,93 ± 0,61a	1,07 ± 0,75b
IHS (%)	7,80 ± 1,63a	7,54 ± 1,32a	5,48 ± 1,42b
Sobrevivência (%)	54,1a	50,3a	87,8b
*Biomassa total estimada (g)	1495,06	1484,17	1434,87

C = controle; H = 17 α-metiltestosterona; HH = *Homeopatila RS®.*

CT: comprimento total; IHS: índice hepatossomático = (peso do fígado/peso vivo) x 100; Sobrevivência = 100 x N final (N inicial – N coletado); *Biomassa total estimada = [(N inicial – N coletado) x sobrevivência (%)] x peso médio final (g).

Valores seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos, valores de sobrevivência pelo teste Chi-quadrado e os demais pelo Teste de Tukey, para um nível de significância de 5%.

Os dados do desempenho demonstram que para o grupo tratado com *Homeopatila RS®*, os parâmetros de comprimento total final e peso final apresentaram-se significativamente inferiores, quando comparados aos demais tratamentos. Contudo, a taxa de sobrevivência foi significativamente maior no grupo que recebeu *Homeopatila RS®* em relação aos demais grupos tratados. Portanto, a densidade final neste tratamento, pode ter implicado num crescimento menor dos animais.

Vera Cruz & Mair (1994), estudando os efeitos da densidade em tilápias nilóticas, com 2.000, 6.000 e 10.000 larvas/m^3 em hapas, durante o período de reversão sexual, verificaram que com o aumento da densidade de estocagem ocorreu redução no crescimento, ganho de peso e sobrevivência destas.

Para Popma & Lovshin (1994), 70% a 80% de sobrevivência final de larvas são considerados valores normais para a fase de reversão sexual de tilápias, onde a mortalidade é considerada elevada, podendo ser encontrados valores de sobrevivência abaixo de 50%. O principal fator que afeta a sobrevivência destas é o estresse ambiental, associado ao estresse fisiológico, quando a reversão é obtida através de hormônios esteróides.

Os animais tratados com *Homeopatila RS®* apresentaram um índice hepatossomático significativamente inferior aos demais grupos tratados. Experimentos realizados em tilápias, não relacionados a intoxicações, apontam para diferenças nos índices hepatossomáticos, que podem estar correlacionadas a uma maior ou menor deposição lipídica ou de glicogênio neste órgão, dependendo da qualidade e quantidade da alimentação, bem como da fase de desenvolvimento dos peixes (Bruslé & Anadon, 1996; Lanna et al., 2004; Cavichiolo, 2005).

As diferenças no metabolismo hepático, nos animais tratados com o núcleo homeopático, podem ser consideradas como fatores que poderiam alterar a proporção do fígado em relação ao peso corporal, uma vez que neste experimento os animais dos diferentes tratamentos apresentavam-se na mesma fase de desenvolvimento.

Na Tabela 5 encontram-se os resultados referentes aos valores médios de alterações (VMA) do fígado de alevinos de tilápias do Nilo, nos diferentes tratamentos.

Os dados contidos na Tabela 5 demonstram que, os valores médios no fígado para inclusão lipídica foram significativamente inferiores no grupo que recebeu *Homeopatila RS*, quando comparados aos outros grupos, não havendo diferença significativa entre os tratamentos em relação à presença de infiltrado leucocitário.

Na Figura 1 observa-se intensa inclusão lipídica (seta) no tecido hepático de alevinos de tilápia do Nilo, em amostra corada pelo Ácido Periódico – Reagente de Schiff (PAS) + Hematoxilina e na Figura 2 infiltrado leucocitário em amostra corada com Hematoxilina/Eosina (HE).

Tabela 5. Achados histológicos no fígado de tilápias do Nilo *(O. niloticus)*, submetidas aos tratamentos: controle, álcool 30ºGL (C); hormonal, 17 α-metiltestosterona (H); homeopático, *Homeopatila RS®*, solução hidroalcóolica (HH), no período de diferenciação gonadal, avaliados em VMA. Valores expressam as médias ± desvio padrão.

Tratamentos	Inclusão lipídica	Infiltrado leucocitário
C (n = 160)	2,12 ± 0,80a	1,12 ± 0,34a
H (n= 160)	2,25 ± 0,68a	1,12 ± 0,50a
HH (n = 160)	1,43 ± 0,72b	1,06 ± 0,25a

C = controle; H = 17 α-metiltestosterona; HH = *Homeopatila RS®.*

VMA: Valor Médio de Alteração, medida semiquantitativa, variando de grau 1 ao 3, grau 1 = nenhuma alteração histológica; grau 2 = alterações moderadas e pontuais; grau 3 = alterações severas e extensas.

Valores seguidos de letras diferentes, indicam diferenças significativas entre os grupos, pelo teste de Mann-Whitney, para um nível de significância de 5%.

Figura 1. Tecido hepático de tilápia do Nilo *(O. niloticus)*, PAS. Intensa inclusão lipídica (seta), ao redor da veia centro lobular, 400x, 17 α-metiltestosterona (H). Valentim-Zabott (2006).
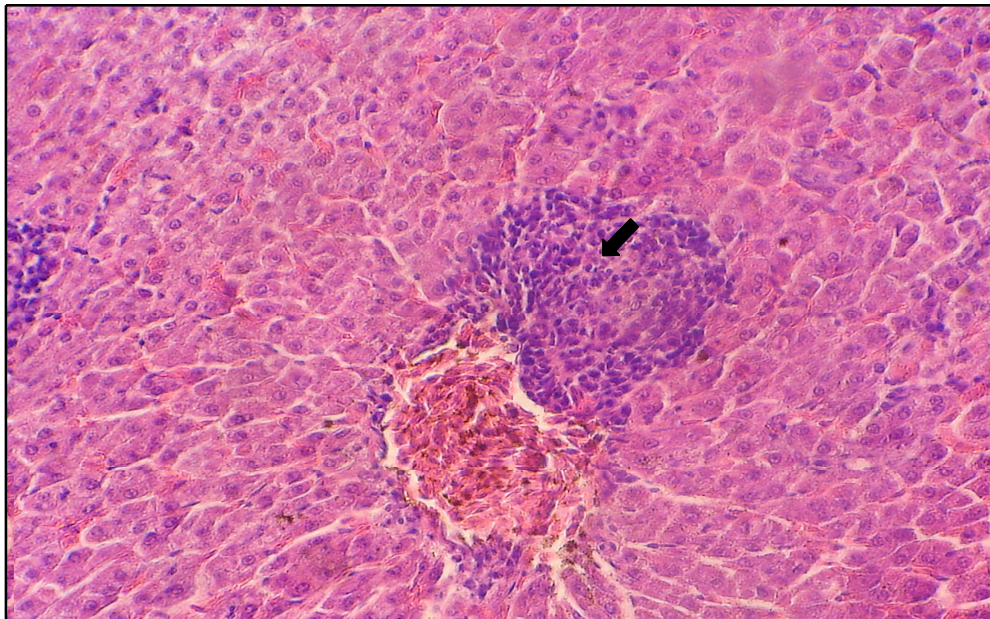
Figura 2. Tecido hepático de tilápia do Nilo *(O. niloticus)*, (HE). Veia centro lobular, presença de infiltrado leucocitário (seta), 400x, 17 α-metiltestosterona (H). Valentim-Zabbot (2006).

Varghese & Oommen (1999) estudaram os efeitos dos hormônios da tireóide na regulação do metabolismo lipídico no teleósteo *Anabas testudineus* e concluíram que estes hormônios causam uma redução significativa da lipogênese hepática, baixando as taxas de triglicerídeos, ácidos graxos livres e colesterol, não ocorrendo alteração na taxa de fosfolipídios quando os animais tratados foram comparados com os controles sem medicação hormonal e os que apresentavam hipotireoidismo induzido.

Foram removidas e identificadas as gônadas masculinas e femininas (Figuras 3 e 4) de 60 peixes de cada repetição (240 em cada tratamento), através da técnica do aceto-carmim proposta por Popma & Green (1990), citada por Wassermann & Afonso (2002).
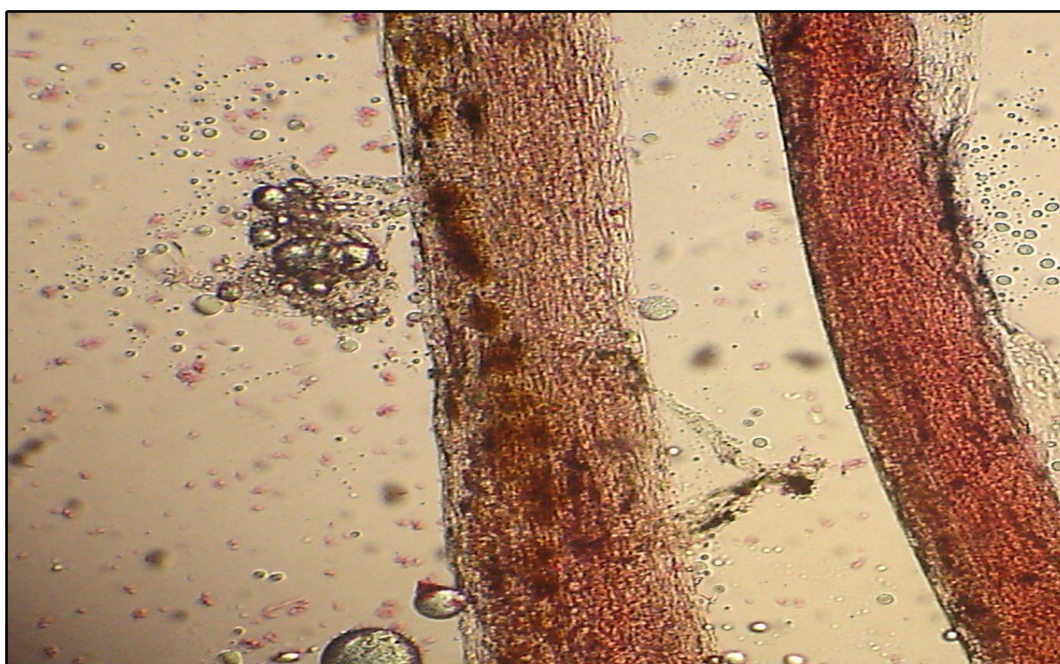
Figura 3. Gônada masculina de tilápia do Nilo *O. niloticus*, 100x. Valentim-Zabott (2006).

Figura 4. Gônada feminina de tilápia do Nilo *(O. niloticus)*, 100x. Valentim-Zabott (2006).

Na Tabela 6 encontram-se os resultados da análise gonadal, demonstrados pela freqüência de diferentes tipos de gônadas identificadas nos tratamentos.

Tabela 6. Proporção gonadal de tilápias do Nilo *(O. niloticus)* submetidas aos tratamentos: controle, álcool 30ºGL (C); hormonal, 17 α-metiltestosterona (H); homeopático, *Homeopatila RS®*, solução hidroalcóolica (HH), no período de diferenciação gonadal.

Tratamentos	Gônadas		
	Masculinas (%)	Femininas (%)	Intersexo (%)
C (n= 240)	52,5 b	47,5 a	0,0
H (n = 240)	95,0 a	0,0 b	5,0
HH (n = 240)	52,5 b	45,0 a	2,5

C = controle; H = 17 α-metiltestosterona; HH = *Homeopatila RS®.*
Valores seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos, pelo teste de Chi-quadrado, para um nível de significância de 5%.

No grupo tratado com *Homeopatila RS®* a proporção de gônadas masculinas não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, sendo significativamente menor do que o tratamento com 17 α-metiltestosterona.

Valentim-Zabott et al. (2008) concluíram que a adição do núcleo homeopático *Homeopatila RS®* na ração de tilápias do Nilo, na fase de diferenciação gonadal, apresentou efeito positivo na sobrevivência dos alevinos e interferiu no índice hepatossomático dos mesmos, onde os animais tratados com homeopatia apresentaram valor médio para inclusão lipídica hepática inferior aos demais grupos tratados. Nos peixes que receberam *Homeopatila RS®* não ocorreu alteração na proporção sexual, no sentido da masculinização das gônadas.

B - Comportamento morfométrico das fibras musculares brancas

Piau Junior (2006) participou do experimento anteriormente citado, desenvolvido por Valentim-Zabott et al. (2008), pesquisando o comportamento morfométrico das fibras musculares brancas de alevinos de tilápias do Nilo *O. niloticus*.

Foram retiradas 16 amostras de tecido muscular da porção mediana dos alevinos de cada tratamento, para a realização das análises. A partir das lâminas coradas pela Hematoxilina-Eosina (HE) foi avaliado o grau de hipertrofia das fibras musculares, pelo método de mensuração do menor diâmetro (Dubowitz et al., 1972), utilizando-se um sistema de análise de imagem computadorizada.

Para cada animal, foram mensuradas 20 fibras, totalizando 320 fibras por tratamento. Além do uso do microscópio ótico Motic B5 professional series, as imagens foram captadas pela câmera Moticam 2000, 2.0M pixel e visualizadas no monitor de 15 polegadas LG com o programa Motic images plus 2.0.

A Tabela 7 apresenta os valores médios dos diâmetros das fibras musculares brancas de alevinos de tilápias do Nilo, nos diferentes tratamentos, no encerramento do experimento aos 45 dias.

Segundo Johnston et al. (1975), o crescimento muscular está associado ao aumento do diâmetro das fibras e influenciado pelo nível nutricional da dieta. A hipertrofia das fibras promove um aumento da massa muscular, aumento da espessura do filé e produção de carne.

Piau Junior (2006) concluiu que os alevinos do tratamento com o núcleo homeopático *Homeopatila RS®* apresentaram maior hipertrofia das fibras musculares do que os do tratamento controle e os que receberam 17 α-metiltestosterona.

Tabela 7. Diâmetro de fibras musculares brancas de tilápias do Nilo *O. niloticus*, submetidas aos tratamentos: controle, álcool 30ºGL (C); homeopático, *Homeopatila RS*®, solução hidroalcóolica (HH); 17 α-metiltestosterona (H). Valores expressam as médias ± desvio padrão.

Parâmetro	Tratamentos		
	C	HH	H
Diâmetro das fibras musculares (µm)	26,92 ± 5,59a	33,01 ± 5,17b	28,84 ± 5,10c

C = controle; H = 17 α-metiltestosterona; HH = *Homeopatila RS*®.
Valores seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos, pela Análise de Variância para Experimento Inteiramente Casualizado, para um nível de significância de 5%.

Homeopatila 100®

A - Desempenho e morfologia de brânquias

Siena (2009) avaliou o efeito do núcleo homeopático *Homeopatila 100*® na morfologia de brânquias e no desempenho em alevinos revertidos de tilápia do Nilo *(O. niloticus)*. Distribuíram-se 832 alevinos machos da linhagem Supreme, em 16 caixas d´água com capacidade de 2.000L, contendo 1.000L cada uma, localizadas numa estufa, durante 61 dias.

Foram avaliadas quatro dietas: uma dieta controle e três contendo diferentes concentrações do núcleo homeopático *Homeopatila 100*® incorporados na ração (Tabela 8).

A composição do núcleo homeopático *Homeopatila 100*®, elaborado pela empresa RealH, encontra-se na Tabela 9.

Os valores médios da temperatura da água, do pH e do oxigênio dissolvido, nos diferentes tratamentos, são apresentados na Tabela 10.

Os parâmetros relacionados à temperatura da água, pH, oxigênio dissolvido, não demonstraram diferenças significativas ($p>0,05$) entre os tratamentos, permanecendo dentro da faixa recomendada por Ribeiro (2001).

Tabela 8. Tratamentos utilizados em alevinos revertidos de tilápia do Nilo *O. niloticus*.

Tratamentos	Dose / kg de ração
T1 (controle)	20 mL de solução hidroalcóolica (álcool 30 º GL)
T2	20 mL de *Homeopatila 100*®
T3	40 mL de *Homeopatila 100*®
T4	60 mL de *Homeopatila 100*®

Tabela 9. Composição do núcleo homeopático *Homeopatila 100®*. Merlini (2006).

Compostos	Diluição
Iodium	10^{-24}
Sulphur	10^{-60}
Natrum muriaticum	10^{-400}
Streptococinum	10^{-60}
Veículo (álcool etílico 30 º GL)	q.s.p.

Tabela 10. Parâmetros físico-químicos da água nos tratamentos. Valores expressam as médias ± desvio padrão.

Parâmetros	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
Temperatura (ºC)	24,96±1,60a	25,02±1,60a	25,14±1,70a	25,02±1,60a
pH	7,55±0,20a	7,54±0,20a	7,55±0,20a	7,60±0,20a
Oxigênio (mg/L^{-1})	2,67±1,14a	1,91±0,86a	2,07±0,77a	1,99±0,95a

T1 (controle) = 20 mL de solução hidroalcóolica (álcool 30 º GL); T2 = 20 mL de *Homeopatila 100®*; T3 = 40 mL de *Homeopatila 100®* e T4 = 60 mL de *Homeopatila 100®* por kg de ração.
Valores seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, pelo teste de Tukey para um nível de significância de 5%.

Foram registrados nos alevinos os valores médios de peso e comprimento total inicial e aos 33 dias. No encerramento do experimento (61 dias), os peixes foram anestesiados com benzocaína (Stoskopf, 1993), sacrificados por secção da medula espinhal e identificado o peso, comprimento total, sobrevivência, conversão alimentar aparente, índice hepatossomático e valores médios de alterações histológicas de brânquias.

A análise dos dados revelou diferenças significativas ($p<0,05$) na sobrevivência e no índice hepatossomático (Tabela 11).

Tabela 11. Desempenho de alevinos revertidos de tilápias do Nilo *O. niloticus*, submetidos aos diferentes tratamentos. Valores expressam as médias ± desvio padrão.

Parâmetros	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
Peso inicial (g)	1,09±0,33a	1,04±0,33a	1,08±0,29a	1,02±0,30a
CT inicial (cm)	4, 20±0,45a	4,11±0,41a	4,15±0,37a	4,14±0,43a
Peso 33 dias (g)	17,80±6,27a	16,14±5,36a	16,59±4,11a	16,93±4,76a
CT 33 dias (cm)	9,65±1,11a	9,40±1,12a	9,52±0,81a	9,67±0,96a
Peso 61 dias (g)	36,69±0,41a	37,10±9,54a	37,15±9,84a	36,33±9,42a
CT 61 dias (cm)	12,69±1,16a	12,94±1,13a	12,96±1,12a	12,71±0,99a
Sobrevivência (%)	90,9a	94,2ab	97,1b	94,7ab
CAA	1,36a	1,29a	1,26a	1,30a
IHS (%)	3,23±1,02a	2,76±0,59ab	2,35±0,68b	2,73±0,78ab

T1 (controle) = 20 mL de solução hidroalcóolica (álcool 30 º GL); T2 = 20 mL de *Homeopatila 100*®; T3 = 40 mL de *Homeopatila 100*® e T4 = 60 mL de *Homeopatila 100*® por kg de ração.
CT: comprimento total; IHS: índice hepatossomático; CAA: conversão alimentar aparente.
Valores seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos, valores de sobrevivência pelo teste Chi-quadrado e os demais pelo Teste de Tukey, para um nível de significância de 5%.

O tratamento T3, utilizando 40 mL *Homeopatila 100*® por kg de ração, apresentou uma sobrevivência significativamente maior em relação ao grupo Controle (T1). Piau Junior (2006) e Valentim-Zabott et al. (2008) demonstraram um efeito semelhante na sobrevivência dos alevinos de tilápias do Nilo tratadas com adição de *Homeopatila RS*® durante a reversão sexual.

As taxas de sobrevivência observadas nos grupos que receberam o núcleo homeopático foram bastante elevadas. Watanabe et al. (1990) relataram que resultados próximos aos 93,5% em alevinos de tilápias são considerados altamente significantes.

O principal fator que afeta a sobrevivência dos alevinos de tilápia do Nilo é o estresse ambiental, associado ao estresse fisiológico (Popma & Lovshin, 1994). O estresse é produzido por um fator ambiental, físico ou biológico que requer ajustes fisiológicos e/ou bioquímicos, resultando numa diminuição da capacidade de sobrevivência do animal, persistindo a exposição ao agente estressante (Val et al., 2004).

Souza (2002) afirmou que o caráter energético da terapêutica homeopática confere aos animais tratados a redução do estresse, especialmente no confinamento, devido a essa situação ser muito diferente do ambiente natural. Animais criados em condições de pouco estresse desenvolvem melhor as suas potencialidades de produção com qualidade.

Os animais que receberam 40 mL *Homeopatila 100®* por kg de ração (T3) apresentaram um índice hepatossomático significativamente inferior ao grupo controle (T1), concordando com os dados registrados por Valentim-Zabott et al. (2008), quando compararam o grupo que recebeu o núcleo homeopático em relação ao controle e ao que recebeu hormônio masculinizante.

O aumento do índice hepatossomático pode estar relacionado com a necessidade de metabolização da proteína animal incluída nas rações, acarretando uma maior atividade do fígado e, conseqüentemente, um aumento no tamanho desse órgão, o que implica em aumento do gasto energético pelo peixe para a utilização do alimento, podendo afetar negativamente os parâmetros de desempenho produtivo (Faria, 2000).

No encerramento do experimento, as alterações histológicas das brânquias foram analisadas semiquantitativamente, seguindo as recomendações de Schwaiger et al. (1997), ordenando-se o nível de severidade das lesões, de acordo com a seguinte escala:
Nível 1 = nenhuma alteração histológica.
Nível 2 = alterações moderadas e pontuais.
Nível = 3 alterações severas e extensas.

Com base nesta escala, um valor médio de alteração histológica (VMA) foi conferido para cada animal. A partir dos dados individuais calculou-se a média de VMA para cada tratamento.

Na Tabela 12 encontram-se os resultados referentes aos valores médios de alterações (V.M.A.) das brânquias de alevinos de tilápia do Nilo, nos diferentes tratamentos.

Tabela 12. Freqüência de alterações histológicas em brânquias de tilápias do Nilo *O. niloticus*, por tratamento, avaliadas em V.M.A.

Alterações	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
Elevação epitelial	1,4 ± 0,6a	1,4 ± 0,6a	1,5 ± 0,5a	1,7 ± 0,4a
Hiperplasia	1,7 ± 0,7a	1,7 ± 0,6a	1,5 ± 0,6a	1,7 ± 0,4a
Telangectasia	1,2 ± 0,5a	1,0 ± 0,2a	1,0 ± 0,2a	1,0 ± 0,2a
Fusão lamelar	1,6 ± 0,7a	1,4 ± 0,5a	1,4 ± 0,5a	1,4 ± 0,5a

V.M.A.: Valor Médio de Alteração, medida semiquantitativa, variando do grau 1 ao 3; Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para os valores médios das alterações histológicas das brânquias. Foram diagnosticados quatro tipos de alterações: elevação epitelial, hiperplasia, telangectasia e fusão lamelar (Mallatt, 1985).

Na Figura 5 verificam-se as alterações histológicas das brânquias de alevinos revertidos de tilápias do Nilo nos diferentes tratamentos.
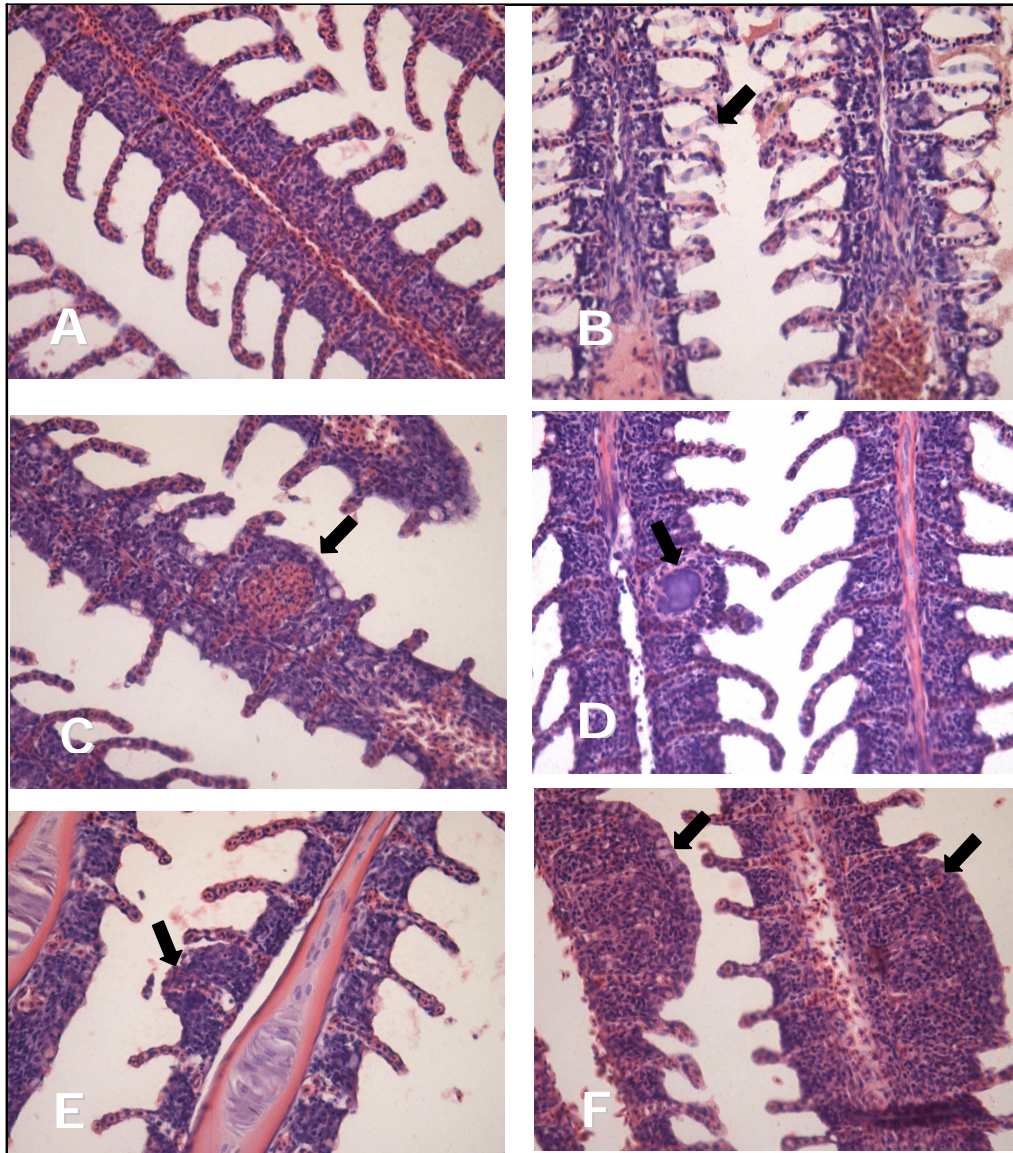
Figura 5. Tecido branquial de alevinos de tilápia do Nilo, HE. **A:** sem alterações, 400x, T3; **B:** elevação epitelial, 400x, T2; **C:** telangectasia, 400x, T1 (controle); **D:** telangectasia, 400x, T1 (controle); **E:** hiperplasia, 400x, T3; **F:** hiperplasia e fusão lamelar, 400x, T4.

Fatores indutores de estresse fisiológico em peixes, tais como: baixa qualidade de água (Mallatt, 1985) e agentes tóxico-irritantes, como metais pesados e pesticidas (Schwaiger et al., 1997), levam a alterações severas na estrutura branquial, comprometendo o funcionamento dos filamentos e lamelas branquiais.

Observou-se uma freqüência relativamente baixa das lesões branquiais nos diferentes tratamentos. Os valores médios dos parâmetros físico-químicos da água nos diferentes tratamentos dentro dos padrões idéias para cultivo de tilápias e a ausência de agentes tóxicos-irritantes devem ter contribuído para a baixa freqüência das alterações brânquiais.

Siena (2009) concluiu que os alevinos revertidos de tilápia do Nilo que receberam 40 mL *Homeopatila 100®* por kg de ração (T3) apresentaram maior sobrevivência e menor índice hepatossomático em relação ao tratamento controle (T1).

B - Cortisol, glicose, parâmetros hematológicos e células sanguíneas

Merlini (2006) pesquisou o efeito do núcleo homeopático *Homeopatila 100®* nos níveis de cortisol, glicose, hemoglobina e nos parâmetros hematológicos de tilápia do Nilo *(O. niloticus)*. Foram utilizados 60 peixes com peso médio inicial de 98,11 ± 0,10 g, distribuídos em seis caixas d'água com capacidade de 1.000 L cada uma, localizadas numa estufa, durante 60 dias.

Foram avaliados dois tratamentos: um controle e o outro recebendo 100 mL de *Homeopatila 100®* por kg de ração. A composição do núcleo homeopático *Homeopatila 100®*, elaborado pela empresa RealH, encontra-se na Tabela 9. Os peixes tratados apresentaram menor nível de cortisol plasmático (Tabela 14).

Os valores médios da temperatura da água, do pH, do oxigênio dissolvido e da amônia, nos dois tratamentos, são apresentados na Tabela 13.

A análise físico-química da água das caixas, relativas à temperatura, pH, oxigênio dissolvido e amônia, não revelou variação e manteve-se dentro da faixa considerada adequada para a espécie, segundo Sipaúba-Tavares (1995).

Tabela 13. Parâmetros físico-químicos da água nos dois tratamentos. Valores expressam as médias ± desvio padrão.

Parâmetros	Tratamentos	
	Controle	*Homeopatila 100®*
Temperatura (ºC)	24,00 ± 0,02	24,00 ± 0,02
pH	6,44 ± 0,10	6,42 ± 0,08
Oxigênio (mg/L^{-1})	7,11 ± 0,92	7,11 ± 0,92
Amônia (mg/L^{-1})	1,9 ± 0,17	1,9 ± 0,17

Nos dias 0, 15, 35 e 60, todos os animais foram anestesiados com benzocaína, segundo Stoskopf (1993) e foi colhido 3,0 mL de sangue em seringa com EDTA (10%), por punção de vaso caudal e centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos, para separação do plasma.

No encerramento do experimento (aos 60 dias) foi coletado um mL do plasma para análise de cortisol plasmático, através do método de Radioimunoensaio, utilizando o kit Coat-a-Count® – DPC – *(Diagnostic Products Corporation*).

A Tabela 14 apresenta os valores médios de cortisol plasmático em tilápia do Nilo submetidas ou não ao tratamento com o *Homeopatila 100*®.

A concentração média de cortisol no grupo que recebeu *Homeopatila 100*® (17,19 ± 0,95ng/mL) foi menor que a verificada por Barcellos et al. (1997), que relataram uma média de 23,0 ng/mL de cortisol em *O. niloticus* criadas em sistema intensivo. Os autores relataram efeito acumulativo do cortisol nos dias 7, 14 e 21 do experimento, o que provavelmente pode ter ocorrido neste estudo, pois a avaliação ocorreu no 60º dia do início do experimento.

O ambiente azul inibe o aumento do cortisol na espécie, sendo que os efeitos metabólicos do estresse social, provavelmente são maiores em condições de cativeiro, pois a oportunidade para a fuga é limitada, influenciando o desempenho dos peixes na aquicultura (Volpato et al., 1989), esses relatos talvez possam ter ocorrido neste experimento, visto que se utilizaram condições semelhantes às citadas, como a criação de tilápia em caixas azuis.

Tabela 14. Níveis de cortisol plasmático em tilápias do Nilo *O. niloticus* nos dois tratamentos. Valores expressam as médias ± desvio padrão.

Parâmetro	Tratamentos	
	Controle	*Homeopatila 100*®
Cortisol plasmático ng/mL	38,68 ± 1,21a	17,19 ± 0,95b

Valores seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, pelo teste t de Student, para um nível de significância de 5%.

A dosagem de glicemia foi realizada nos dias zero, 15, 35 e 60, através do método enzimático, utilizando-se kit da Labtest (Glicose God-Ana®). Os resultados obtidos foram expressos em mg/dL.

A Tabela 15 apresenta os valores médios de glicose plasmática em tilápia do Nilo submetidas ou não ao tratamento com o *Homeopatila 100*®.

Os resultados da análise da glicemia demonstraram uma diminuição significativa no nível de glicose do tratamento com *Homeopatila100*® a partir de 35 dias do experimento, sugerindo que o efeito do produto não é imediato.

As respostas ao estresse são divididas em três categorias: primária, secundária e terciária. As primárias são hormonais, as secundárias são as mudanças nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos e as terciárias são o comprometimento do crescimento, mudanças no comportamento e aumento da susceptibilidade a doenças (Mazeaud et al., 1977). O cortisol é utilizado

para caracterizar a resposta primária, e a glicose a resposta secundária do estresse em peixes (Nolan et al., 1999).

Tabela 15. Níveis de glicose plasmática em tilápias do Nilo (*O. niloticus*) nos dois tratamentos. Valores expressam as médias ± desvio padrão.

Tratamentos	Início	15 dias	35 dias	60 dias
Controle	57,43±0,44a	58,43±1,15a	57,90±1,21a	58,37±1,32a
Homeopatila100 ®	57,43±0,44a	57,43±0,44ª	43,57±0,68b	34,60±1,07b

Valores seguidos de letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para cada dia de analise, pelo teste t de Student, para um nível de significância de 5%.

Na Tabela 16 estão apresentados os valores médios dos parâmetros eritrocitários e tromboleucocitários de tilápia do Nilo submetidas ou não ao tratamento com *Homeopatila 100®*. O núcleo homeopático *Homeopatila 100®* alterou significativamente todos os parâmetros hematológicos pesquisados, quando comparado ao grupo controle.

Tabela 16. Parâmetros hematológicos de tilápias do Nilo tratadas ou não (controle), com Homeopatila 100® durante o período experimental. Valores expressam as médias ± desvio padrão.

	Início		15 dias		35 dias		60 dias	
Parâmetros	Controle	Homeopatila	Controle	Homeopatila	Controle	Homeopatila	Controle	Homeopatila
Hct (%)	29,9±0,9a	29,2±0,7a	29,7±0,8a	30,4±0,8a	30,4±0,6a	30,8±0,9a	32,8±0,8b	30,9±0,8a
Hb (g/dL)	4,9±0,4a	5,0±0,2a	4,9±0,5a	5,11±0,2a	5,2±0,3a	5,1±0,2a	5,9±0,3b	5,4±0,2a
RBC (x 10^6/µL)	2,63±0,38a	2,40±0,29a	2,88±0,44b	2,34±0,24a	3,08±0,36b	2,29±0,11a	3,15±0,19b	2,27±0,12a
VCM (fL)	132,2±2,1a	130,9±4,7a	132,7±1,9a	132,9±1,5a	119,4±4,4a	133,2±1,2b	100,9±1,5a	133,7±0,7b
HCM (pg)	22,3±0,4a	22,5±0,3a	22,2±0,5a	22,3±0,5a	21,5±0,4a	22,3±0,8b	19,4±0,3a	22,3±0,7b
CHCM (g/dL)	16,4±0,4a	16,4±0,4a	16,4±0,3a	16,2±0,3a	16,7±0,4a	16,4±0,4a	19,5±0,5b	16,2±0,3a
Linfócitos (%)	29,9±1,5a	30,7±2,6a	29,2±2,8a	30,9±1,1a	41,7±2,0a	42,5±1,7a	41,8±1,4a	43,5±0,9a
Neutrófilos (%)	25,2±0,9a	25,2±2,0a	25,7±0,7a	25,4±1,6a	28,9±1,1a	30,8±1,7b	31,7±1,5b	30,0±0,9a
Monócitos (%)	4,6±0,4b	4,1±0,5a	4,7±0,5b	4,1±0,2	5,4±0,4a	5,4±0,3a	7,0±0,2a	6,7±0,4a
Eosinófilos (%)	2,2±0,3b	1,9±0,2a	2,5±0,3b	2,0±0,3a	1,6±0,2a	1,9±0,3b	1,2±0,2a	1,9±0,2b
Basófilos (%)	0,9±0,1a	1,0±0,2a	1,1±0,3a	1,0±0,2a	1,1±0,1a	1,0±0,2a	1,0±0,1a	1,0±0,1a
Trombócitos (%)	65,8±4,1a	62,8±3,5a	67,8±1,2b	58,3±1,1a	62,5±1,6a	68,1±1,1b	57,8±1,4a	69,7±1,0b

Hct: Hematócrito; Hb: Hemoglobina; RBC: Red blood cells/Eritrócitos totais; VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração Hemoglobina Corpuscular Média.

Em peixes estressados, as alterações hematológicas geralmente, são acompanhadas de hiperglicemia e aumento de hemoglobina, decorrente da liberação aumentada de cortisol, que induz incremento da gliconeogênese hepática (Carneiro, 2001).

O hematócrito, a concentração da hemoglobina e o número de linfócitos são considerados indicadores hematológicos auxiliares da resposta ao estresse em peixes (Carneiro & Urbinati, 1998).

O aumento do hematócrito apresentou alteração no grupo-controle de 29,95% (início) para 32,80% (após 60 dias), o qual pode estar associado com maior demanda de oxigênio nos peixes. Em tilápias do Nilo criadas em sistema intensivo, índice de 28,6% foi relatado por Tavares-Dias & Faustino (1998); 30,6% por Silveira & Rigores (1989); 36,8% por Allen (1994); 28,0% por Nussey et al. (1995) e 27,8% por de Ueda et al. (1997).

No final do experimento, o grupo-controle apresentou nível médio de hemoglobina de 5,9 g/dL e o grupo-tratado de 5,4 mg/L. Para tilápia do Nilo valor de 1,4 mg/L (Silveira & Rigores, 1989); 1,3 mg/L (Alkahem,1994); 1,9 mg/L (Allen, 1994); 1,9 mg/L (Nussey et al., 1995) e 2,4 mg/L (Tavares-Dias & Faustino, 1998), os quais foram menores que os observados no presente estudo. Por outro lado, Ueda et al. (1997) relatam valor médio maior que o encontrado aqui para tilápia do Nilo, 7,0 mg/L. Contudo, estes últimos autores realizaram apenas uma colheita de sangue para dosagem de hemoglobina, enquanto no presente estudo foi realizado quatro colheitas.

A contagem média de eritrócitos nos peixes controle foi de 3,10 x 10^6/µL nos peixes tratados com (*Homeopatila 100*®) foi de 2,30 x 10^6/µL. Esses valores são similares aos descritos por Allen (1994) de 2,19 x 10^6/µL e por Tavares-Dias & Faustino (1998) de 1,73 a 4,83 x 10^6/µL, em tilápia do Nilo também sadias. Outros pesquisadores encontraram valores menores, como Alkahem (1994), que relatou valores de 1,31 x 10^6/µL e Silveira & Rigores (1989) de 1,41 x 10^6/µL, para essa mesma tilápia.

O volume corpuscular médio (VCM) encontrada no grupo tratado foi 133,69 fL; valor menor ao relatado por Silveira & Rigores (1989) que encontrou média de 214,70%; Allen (1994) de 180,8 fL; Alkahem (1994) de 246,4 fL, Nussey et al. (1995) de 149,0 fL e Bittencourt (2003) de 148,8 fL.

A hemoglobina corpuscular média (HCM) no grupo tratado foi de 22,3 pg; valor menor que o encontrado por Silveira & Rigores (1989), que relataram valor de 35,8 pg; por Allen (1994) de 52,4 pg; por Alkahem (1994) de 48,8 pg; Nussey et al. (1995) de 45,0 pg; por Tavares-Dias & Faustino (1998) de 37,4 pg; por Ueda et al. (1997) de 30,3 pg; por Bittencourt et al. (2003) de 40,7 pg e por Barros et al. (2004) de 29,9 pg, sendo todas tilápias criadas em sistema intensivo.

A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) no grupo que recebeu *Homeopatila 100*® foi de 16,2 g/dL. Porém, Silveira & Rigores (1989) relataram valor de 17,7 g/dL; Allen (1994) de 33,8 g/dL; Alkahen (1994) de 20,2 g/dL; Nussey et al. (1995) de 33,0 g/dL; Tavares-Dias & Faustino (1998) de 33,8 g/dL; Ueda et al. (1997) de 25,7 g/dL e Bittencourt et al. (2003) de 35,2 g/dL, todas tilápias criadas em sistema intensivo.

As tilápias que receberam *Homeopatila 100*® apresentaram no final do experimento aumento no percentual médio de linfócitos, eosinófilos e trombócitos ($p<0,05$), mas neutrófilos diminuíram ($p>0,05$) e não houve

diferenças significativas no percentual de monócitos e basófilos ($p>0,05$), em relação ao tratamento controle (Tabela 16).

Os peixes que receberam *Homeopatila 100*® apresentaram maior percentual de células de defesa orgânica, como os trombócitos e linfócitos. Feldman et al. (2000) ressaltaram que a resposta leucocitária é uma ferramenta importante para análise do estado de saúde dos animais e tem papel de destaque no desenvolvimento da imunidade humoral e celular. Os linfócitos B produzem e secretam anticorpos contra agentes infecciosos e os linfócitos T destroem as células infectadas com microrganismos (Tavares-Dias & Moraes, 2004). Assim, aumento no percentual de linfócitos dos peixes que receberam *Homeopatila 100*® poderia prepará-los melhor para uma situação de estresse. Contudo, isso precisa ainda ser investigado em estudos de desafios com situações de estresse. Por outro lado, redução na quantidade de linfócitos representa uma possível redução na capacidade imunológica dos peixes, provocada por estresse (Barton & Iwama, 1991), sendo um fenômeno mediado pelo cortisol.

No grupo controle, observou-se valores médios do percentual de neutrófilos variando de 25,2% a 31,7%. Em tilápias criadas no sistema intensivo, Silveira & Rigores (1989) relataram valor de 1,6% de neutrófilos; Nussey et al. (1995) de 7,8%; Alkahem (1994) de 3,2%; Tavares-Dias & Faustino (1998) de 6,7% e Ueda et al. (1997) de 6,3%.

Após 35 e 60 dias, os peixes que receberam *Homeopatila 100*® mostraram aumento no percentual de neutrófilos (Tabela 16). Tavares-Dias & Moraes (2004) citam que os neutrófilos são células eficientes na fagocitose e destruição intracelular de agentes infecciosos e substâncias estranhas.

Os monócitos são células responsáveis pela fagocitose ou digestão de partículas estranhas ao corpo (Tavares-Dias & Moraes, 2004). Não houve diferenças significativas entre os grupos, o grupo controle teve 7,04 ± 0,19% e o grupo-tratado 6,78 ± 0,40% de monócitos. Ueda et al. (1997) encontraram média de 6,37 % de monócitos; Tavares-Dias & Faustino (1998) 7,8%; Silveira & Rigores (1989) 8,0% em *O. niloticus* criadas em sistema intensivo. Outros pesquisados relataram percentual diferente em tilápia do Nilo criadas no sistema extensivo, como: Alkahem (1994) 2,6% e Nussey et al. (1995) 21,2%.

Os eosinófilos são responsáveis pelo combate às infecções parasitárias, estão presentes no sangue periférico de peixes em baixo percentual, são observados com maior frequencia em órgãos hematopoiéticos do que em sangue circulante possivelmente, onde são detectados na circulação somente quando necessários (Tavares-Dias & Moraes, 2004). No grupo-tratado, o percentual médio dessas células foi de 1,95%, próxima à relatada por Ueda et al. (1997) em média de 0,09%, Alkahem (1994) 1,0% e Nussey et al. (1995) 1,2% e inferior à registrada por Tavares-Dias & Faustino (1998) de 4,0% em *O. niloticus* criadas em sistema intensivo.

Em tilápias do Nilo, o tratamento com núcleo homeopático *Homeopatila 100*® alterou os níveis de cortisol, glicose e alguns parâmetros hematológicos, como o porcentual de linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e trombócitos, quando comparados com os peixes do grupo controle (Merlini, 2006).

Considerações finais

Os resultados documentados na utilização de homeopatia populacional em tilápias do Nilo e a realização de novos estudos complementares poderão permitir o emprego de núcleos homeopáticos em diferentes fases do cultivo de tilápias.

Referências

ALKAHEM, M. F. 1994. The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on haematological parameters and behavior of the fish, *O. niloticus. J. Univer. Kuwait,* 21:243-252.

ALLEN, P. 1994. Changes in the hematological profile of the cichlid *O. aureus* during acute inorganic mercury intoxication. *Comp. Bioch. Physiol. C. Pharm. Toxicol. Endocrinol.*, 108:117-121.

BALDISSEROTTO, B. 2002. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura.* Santa Maria: Ed. UFSM.

BARCELLOS, L. J. G.; SOUZA, S. M. G.; LOURENÇO, L. F. 1997. Estudos preliminares sobre o cortisol em resposta ao estresse na tilápia no Nilo (*Oreochromis niloticus). Boletim do Instituto de Pesca,* 224:239-245.

BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. 1991. Physiological changes in fish form stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases,* 10:3-26.

BENEZ, S. M.; JACOBS, P. H.; CAIRO, N. 2004. *Manual de Homeopatia Veterinária.* Ribeirão Preto: Tecmed.

BENITES, N. R. 2002. Homeopatia. In: SPINOSA, H. S.; GORNIAK, S. L.; BERNARDI, M. M. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.700-708.

BITTENCOURT, N. L. R. 2003. Hematological and biochemical values for Nile tilapia *O. niloticus* cultured in semi-intensive system. *Acta Scientiarum*, 25:385-389.

BRUSLÉ, J.; ANADON, C. G. I. 1996. The structure and function of fish liver. In: MUNSHI, J. S. D.; DUTTA, H. M. Fish Morphology, Horizon of New Research. Enfield: Science Publisher Inc., p.77-93.

CAMARGO, A. A. C.; DAL PAI SILVA, M.; PELLIZON, C. H.; CARVALHO, R. F. 2004. Aspectos morfológicos da regeneração muscular na tilapia do Nilo *(Oreochromis niloticus). Int. J. Morphol.,* 22:1.

CARNEIRO, P. C. F. 2001. *Estresse provocado pelo transporte e resposta fisiológica do matrinxã Brycon cephalus.* 137 f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Universidade Estadual Paulista.

CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. 1998. Alterações metabólicas, hematológicas e osmorregulatórias do matrinxã *Brycon cephalus* causadas pelo estresse de transporte. *Anais Simbraq*, 609-620.

CAVICHIOLO, F. 2005. Desempenho e morfologia de brânquias e fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com diferentes níveis e fontes de proteínas. 57 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

DUBOWITZ, V.; BROOKE, M. H.; NEVILLE, H. 1972. *Muscle biopsy: a modern approach.* London: Saunders.

EL-SAYED, A.-B. M. 2006. *Tilapia Culture*. Wallingford: CABI Publishing.

FARIA, A. C. E. A. 2000. *Farinha de vísceras em dietas para alevinos de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus)*. 50 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

FELDMAN, D. M.; ZINK, J. G.; JAIN, N. C. 2000. *Schalm's veterinary hematology.* 5. ed. Philadelphia: Donna Balado.

GUEDES, J. R. P.; FERREIRA, C. M.; GUIMARÃES, H. M. B.; SALDIVA, P. H. N.; CAPELOZZI, V. L. 2004. Homeopathically prepared dilution of *Rana catesbeiana* thyroid glands modifies its rate of metamorphosis. *Homeopathy,* 93:132-137.

HAHNEMANN, S. 2001. *Organon da arte de curar.* São Paulo: Robe Editorial.

JOHNSTON, M. D.; STEWART, D. F.; MOODY, W. G.; BOLLING, J. A.; KEMP, J. A. 1975. Effect and time of feed on size distribution of bred muscle fiber types. *J. Anim. Sci.,* 40:613-620.

JOSUPEIT, H. 2007. World tilapia trade. Disponível em: <www.globefish.org/dynamisk.php4?id=4278>. Acesso em: 28 abr. 2009.

KHUDA-BUKHSH, A. R. 2003. Towards understanding molecular mechanisms of action of homeopathic drugs: An overview. *Mol. Cell. Biochem.,* 253:339-345.

LANNA, E. A. T.; PEZZATTO, L. E.; FURUYA, W. M. 2004. Fibra bruta e óleo em dietas práticas para alevinos de tilápia do Nilo *(Oreochromis niloticus)*. *Rev. Bras. Zoot.*, 33:2177-2185.

LOPES, E. G. 2004. Homeopatia aplicada à parasitologia veterinária. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINARIA, 12.; SIMPÓSIO LATINOAMERICANO DE RICKETSIOSES, 1., 2004, Ouro Preto. *Anais...* Ouro Preto: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, p. 150-155.

MALLATT, J. 1985. Fish gill structural changer induced by toxicants and other irritants: A statistical review. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42:630-648.

MAURY, E. A. 2002. *Guia das plantas medicinais.* São Paulo: Rideel.

MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E. M. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Trans. Amer.Fish. Soc.,* 106:201-212.

MERLINI, L. S. 2006. Utilização de Homeopatila 100® em dieta para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). 50 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

NOLAN, D. T.; VELD, R. L. J. M. O.; BALM, P. H. M.; BONGA, S. E. W. 1999. Ambient salinity modulates the response of the tilapia, *Oreochromis mossambicus,* to net confinement. *Aquaculture*, 177:297-309.

NUSSEY, G.; VAN VUREN, J. H. J.; DU PREEZ, H. H. 1995. Effects of copper on the haematological and osmoregulation of the Mozambique tilapia. *Comp. Biochem.Physiol.C. Pharm.Toxicol.Endocrinol.*, 111:369-380.

PIAU JUNIOR., R. 2006. *Comportamento morfométrico das fibras musculares brancas e desempenho de alevinos de tilápias do Nilo (Oreochromis niloticus), tratados com metiltestosterona ou núcleo* homeopático. 47 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

POPMA, T. J.; LOVSHIN, L. L. 1994. *Worldwide prospects for commercial production of tilapia*. Auburn: Auburn University.

REAL, C. M. 2006. Homeopatia Populacional (Homeopatia de resultados). Disponível em:<www.realh.com.br/index_br.php? idcanal= 43>. Acesso em: 22 nov. 2007.

RIBEIRO, R. P. 2001. Espécies exóticas. In: MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; ZIMMERMANN, S. *Fundamentos da Moderna Aqüicultura*. Canoas: Ed. ULBRA, p.91-115.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWER, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery*, 6:75-86.

SIENA, C. E. 2009. Efeito do núcleo homeopático *Homeopatila 100®* na eficiência produtiva em alevinos revertidos de tilapia do Nilo *(Oreochromis niloticus).* 27 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

SILVEIRA, R.; RIGORES, C. 1989. Características hematológicas normales de *O. aureus* em cultivo. *Rev. Latinoam. Acuicul.,* 39:54-56.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. S. 1995. *Limnologia aplicada à aqüicultura.* Jaboticabal: FINEP.

SOUZA, M. F. A. 2002. Homeopatia Veterinária. In: CONFERÊNCIA SOBRE PRODUÇÃO ORGÂNICA DE BOVINOS DE CORTE, 1., 2002. Anais... Corumbá: Embrapa Pantanal. Disponível em: www.cpap.embrapa.br/ agencia/congressovirtual/pdf/portugues/02pt02.pdf. Acesso em: 14 out. 2003.

STOSKOPF, M. K. 1993. *Fish medicine.* 9. ed. Raleigh: W.B. Saunders Company.

TAVARES-DIAS, M.; FAUSTINO, C. D. 1998. Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (Ciclidae) em cultivo extensivo. *Ars Veterinária,* 14:254-263.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2004. *Hematologia de peixes teleósteos*. Ribeirão Preto: Lillimpress Complexo Gráfico.

UEDA, I. K.; EGAMI, M. I.; SASSO, W. S.; MATUSHIMA, E. R. 1997. Estudo hematológico do sangue periférico de *O. nilocitus* (Linneus, 1758). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.,* 34:270-275.

VAL, A. L.; SILVA, M. de N. P. da; VAL, V. M. F. de A. 2004. Estresse em peixes – Ajustes fisiológicos e distúrbios orgânicos. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. A. P. *Sanidade de organismos aquáticos.* São Paulo: Livraria Varela, p.75-88.

VALENTIM-ZABOTT, M. 2006. *Avaliação de Homeopatila RS, em tilápias do Nilo, Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758), fase de larvicultura, no desenvolvimento, proporção sexual e histologia de brânquias e fígado*. 50 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

VALENTIM-ZABOTT, M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; PIAU JUNIOR, R.; TORRES, M. B. A.; RÖNNAU, M.; SOUZA, J. C. 2008. Effects of a homeopathic complex in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) on performance, sexual proportion and histology. *Homeopathy*, 97:190–195.

VARGHESE, S.; OOMMEN, O. V. 1999. Thyroid hormones regulate lipid metabolism in a teleost *Anabas testudineus* (Bloch). *Comp. Biochem. Physiol.*, 124:445-450.

VERA CRUZ, E. M.; MAIR, G. C. 1994. Conditions for effective androgen sex reversal in *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture,* 122:237-248.

VOLPATO, G. L.; CARRIERI, M. P.; FERNANDES, M. O. 1989. Heterogeneous growth in fishes: some new data in the Nile tilapia and a general view about the causal mechanisms. *Bol. Fisiol. Anim.,* 13:7-22.

WASSERMANN, G. J.; AFONSO, L. O. B. 2002. Validation of the aceto-carmine technique for evaluating phenotypic sex in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. *Ciência Rural,* 32:133-139.

WATANABE, W. O.; ERNST, D. H.; OLLA, B. L.; WICKLUND, R. I. 1990. Aquaculture of red tilapia (*Oreochromis* sp) in marine environments: state of the art. Advances in Tahiti, French Polynesie tropical aquaculture. *Actes Colloque.*, 9:487-499.

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 7

Suplementos na dieta para manutenção da saúde de peixes

Edsandra Campos Chagas, Fabiana Pilarski, Róberson Sakabe,
Haluko Massago & Thiago El Hadi Perez Fabregat

Resumo
O estabelecimento das exigências nutricionais de vários peixes cultivados tem trazido benefícios para o seu crescimento, eficiência alimentar e sobrevivência. Recentemente, o foco dessas pesquisas tem se expandido, sendo considerado também o efeito dos nutrientes dietéticos sobre a saúde dos peixes. Este capítulo traz informações atualizadas sobre os efeitos de alguns nutrientes essenciais e outras substâncias com características imunoestimulantes, enfatizando os aspectos relacionados à nutrição e saúde dos peixes cultivados. As exigências de nutrientes essenciais (especialmente lipídios, minerais e vitaminas) variam em função de diversos fatores, entre eles a demanda metabólica do peixe (resposta de estresse, resistência a enfermidades, entre outras). Níveis superiores aos estabelecidos para se alcançar o máximo crescimento e utilização do alimento têm sido utilizados para maximizar as concentrações corporais e atender as funções fisiológicas dos peixes. O uso de suplementos alimentares originados de micro-organismos, plantas e animais tem influenciado positivamente a resistência dos peixes frente a desafios de infecções. O emprego de imunoestimulantes na dieta dos peixes é uma alternativa para maximizar a sua proteção em situações de estresse, evitando o estabelecimento de doenças na criação. Contudo, muitos estudos ainda estão sendo conduzidos para elucidar o papel dos imunoestimulantes na saúde dos peixes.

Abstract
The establishment of the nutritional requirements for several farmed fish has brought benefits for growth, feeding efficiency and survival. Recently, the target of the researches has expanded to consider the role of the dietary nutrients on the fish health. This chapter brings updated information on the effects of some macro and micronutrients, and on other substances with immunostimulant features, emphasizing aspects related to the nutrition and

the fish health. The requirements of essential nutrients (especially lipids, minerals and vitamins) vary according different factors, including the metabolic demand (stress response, resistance to diseases among others). Levels above those required for maximum growth performance and feed utilization have been used to maximize the body concentrations and supply the physiological needs of fish. The use of feed supplements originated from microorganisms, plants and animals has improved the fish resistance to infections. Otherwise, the inclusion of immunostimulant substances in the fish diet is an alternative to enhance fish protection in stress conditions preventing the diseases in the farming environment. Furthermore, studies have been developed to understand the role of the immunostimulant substances in fish health.

Introdução

A demanda crescente do mercado mundial por produtos de alta qualidade tem estimulado o crescimento da aqüicultura. Nos últimos 50 anos, a produção mundial de pescado passou de menos de 1 milhão de toneladas no começo da década de 50 para 59,4 milhões em 2004, o que representou um incremento anual da ordem de 6,9% (FAO, 2007). No Brasil, a produção aquícola e pesqueira alcançou, em 2006, um volume de 1.049.539 toneladas, com acréscimo de 4,01% em comparação a 2005. A aqüicultura participou com 25,9% (271.694,5 toneladas) dessa produção e gerou uma receita de US$ 965.627,60 (Ibama, 2007).

Com o crescimento da aqüicultura, houve uma maior intensificação dos sistemas de criação, expondo continuamente os peixes a alterações na qualidade da água e a práticas de manejo tais como manuseio excessivo, transporte e adensamento, que induzem respostas de estresse, com conseqüências negativas sobre o desempenho produtivo, resposta imune e resistência dos peixes à patógenos (Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 2000; Barton et al., 2000; Brandão et al., 2006). Nos sistemas de criação intensiva, a nutrição tem um importante papel na manutenção do crescimento normal e da saúde dos organismos aquáticos.

As dietas artificiais constituem a principal fonte de nutrientes essenciais para os peixes em sistemas de criação intensiva. A exigência dos nutrientes essenciais varia em função de diversos fatores, entre eles a demanda metabólica do peixe (resposta de estresse, resistência a enfermidades, entre outras). Níveis superiores aos estabelecidos para se alcançar o máximo crescimento e utilização do alimento têm sido utilizados para maximizar as concentrações corporais e atender as funções fisiológicas dos peixes (Li & Robinson, 1999; Gatlin III, 2002). Nesse sentido, o uso de alimentos funcionais, que atuam na manutenção do equilíbrio orgânico dos animais frente a condições adversas inerentes à criação intensiva, desponta como uma alternativa promissora para a aqicultura.

Historicamente, os antibióticos têm sido utilizados para o tratamento de doenças na aqüicultura. Contudo, o uso dessas drogas tem ocasionado problemas como o desenvolvimento de bactérias resistentes e a ocorrência de resíduos de antibióticos nos tecidos de peixes comercializados (Buchman et al., 1992; Grant & Briggs, 1998; Smith et al., 2003; Sorum, 2006). Assim, muitos pesquisadores têm dado ênfase ao emprego das Boas Práticas de

Manejo (BPMs) (Boyd & Queiroz, 2004), com o uso de imunoestimulantes (Sakai, 1999; Li & Gatlin III, 2006; Dalmo & Bogwald, 2008).

O emprego de imunoestimulantes na dieta dos peixes tem influenciado positivamente a resistência desses animais frente à infecção por organismos patogênicos, por meio de mecanismos imunes inato e adquirido (Erdal et al., 1991; Raa, 1996; Verlhac et al., 1998; Amar et al., 2001; Vainikka et al., 2005). Portanto, uma melhora na condição imune do organismo por manipulação dietética representa uma alternativa para o uso de drogas na aqüicultura (Verschuere et al., 2000).

Dentre os compostos com características imunoestimulantes destacam-se os fatores nutricionais como as vitaminas, substâncias derivadas de bactérias, polissacarídeos, extratos de plantas e animais, além das substâncias químicas sintéticas (Sakai, 1999; Cook et al., 2003; Smith et al., 2003; Vainikka et al., 2005; Li & Gatlin III, 2006). Estes compostos são de fácil administração e apresentam baixa toxicidade para o hospedeiro, podendo ser administrados por meio de imersão, injeção ou como um suplemento dietário (Smith et al., 2003).

Para manutenção da saúde em peixes cultivados, algumas estratégias alimentares podem ser adotadas como: atender as exigências nutricionais específicas nas dietas; manipular a condição nutricional por meio de regimes de alimentação, além da administração de imunoestimulantes dietéticos (Maita, 2007). O estabelecimento de protocolos de imunoestimulação para peixes permitirá maximizar a sua proteção em situações de estresse, reduzindo o estabelecimento de doenças na criação, além de melhorar o desempenho zootécnico e sobrevivência dos peixes e, consequentemente, reduzir as perdas econômicas no processo produtivo.

Nutrientes essenciais

A – Vitaminas

As vitaminas constituem um grupo de substâncias orgânicas com composição química e funções biológicas variadas. São conhecidas como agentes essenciais para o crescimento, saúde, reprodução e manutenção do organismo, funcionando principalmente como coenzimas. Podem ocorrer na natureza como vitaminas ou sob a forma de precursores, as provitaminas, que são ingeridas com os alimentos. São compostos orgânicos requeridos pelo corpo em quantidades mínimas para realizarem funções celulares específicas. Qualquer interrupção de seu suprimento ocasiona distúrbios no metabolismo, sendo, por isso, consideradas itens nutricionais fundamentais para o desenvolvimento adequado de qualquer organismo (Lovell, 1989; Lehninger, 1993).

As vitaminas são classificadas em tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), cianocobalamina (vitamina B12), niacina, ácido pantotênico, biotina, ácido fólico, ácido ascórbico (Vitamina C, AA), inositol, vitamina A, vitamina D, vitamina E e vitamina K (Lehninger, 1993; Champe & Harvey, 1997; Eitnmiller & Landen Junior, 1999). Todavia, as mais estudadas em organismos aquáticos são as vitaminas C, E, A e D (Martins, 1995; Fracalossi et al., 1998; Blom & Dabrowski, 2000; Lovell, 2000; Dabrowski, 2001; Fujimoto & Carneiro, 2001; Barros et al., 2002; Chagas & Val, 2003; Chagas

et al., 2003; Chagas & Val, 2006; Abreu & Urbinati, 2006; Pilarski, 2006; Koshio, 2007; Garcia et al., 2007; Guimarães, 2009; Cerezuela et al., 2009). As vitaminas são divididas em duas classes distintas, as lipossolúveis como as vitaminas A, D, K e E, e as hidrossolúveis, como as vitaminas do complexo B e vitamina C (Lehninger, 1993; Champe & Harvey, 1997; Eitnmiller & Landen Junior, 1999).

a) Ácido ascórbico (AA) ou vitamina C

O ácido ascórbico (Figura 1) é um composto constituído por seis átomos de carbono, com um peso molecular de 176,1 daltons. Essa vitamina libera facilmente dois íons hidrogênio para assumir uma forma oxidada conhecida como ácido deidroascórbico, que pode ser reduzida por reação reversível. É um pó branco a ligeiramente amarelo cristalino que apresenta alta solubilidade em água (30 g 100 ml^{-1}) à temperatura ambiente (Eitenmiller & Landen Junior, 1999). Agente redutor potente atua como importante antioxidante, dado o seu alto potencial de redução capaz de promover a oxidação dos ácidos graxos. O AA está intimamente relacionado com o metabolismo da glicose e outras hexoses (Robbins et al., 1986), sendo conhecido como a vitamina de maior atividade anti-estresse, correlacionada com saúde em humanos, animais e cultura de células (Misra et al., 2007; Tewary & Patra, 2008; Sarma et al., 2009). Em determinadas situações, pode também atuar como pró-oxidante (Kaneko et al., 1997) e é um nutriente essencial para a manutenção das funções fisiológicas e para proporcionar o crescimento normal de todos os animais (Smith et al., 1983; McCluskey, 1985), incluindo os peixes (Martins, 1995; Fracalossi et al., 1998; Blom & Dabrowski, 2000; Lovell, 2000; Dabrowski, 2001; Barros et al., 2002; Chagas & Val, 2003; Chagas et al., 2003).
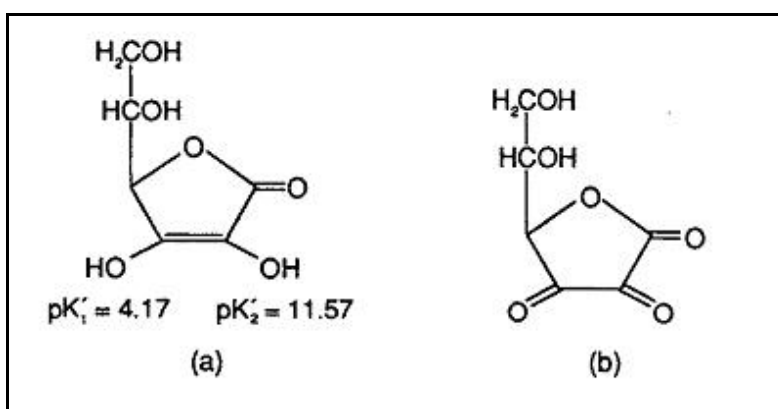
Figura 1. Estrutura do ácido ascórbico (**a**) e do ácido *L*-ascórbico (**b**).

O AA participa como co-fator em diversas reações, dentre elas, a hidroxilação da prolina na síntese de colágeno (principal componente do tecido conectivo), hidroxilação do triptofano para 5-hidroxitriptofano, o qual por descarboloxilação dá origem a serotonina, conversão do 3,4-dihidroxifenilpiruvato para norepinefrina a partir da dopamina (Baker, 1967; Sgarbieri, 1987) e da hidroxilação na biossíntese da carnitina, responsável pelo transporte de alguns ácidos graxos de cadeia longa para o interior das mitocôndrias, onde são utilizados como fonte de energia, pela via beta-oxidativa. O AA está envolvido, ainda, no metabolismo de lipídeos e de certos peptídeos neuroendócrinos, na hidroxilação da tirosina, utilizada na síntese de catecolaminas e de íons metálicos e também auxilia na manutenção de várias enzimas envolvidas neste processo, as quais contém metais, geralmente ferro e cobre, e o ácido ascórbico é o responsável por manter esses metais no estado reduzido (Dabrowski, 2001).

A vitamina C evita a formação de compostos insolúveis e auxilia na absorção do ferro, reduzindo-o no estômago, ao estado ferroso, forma esta absorvível, prevenindo assim a anemia (Barros et al., 2002). Participa, ainda, na liberação do ferro da transferrina e ferritina, da forma oxidada para a forma reduzida, que é subseqüentemente, incorporada à hemoglobina ou a outros compostos essenciais, favorecendo o seu transporte no organismo (Lovell, 1989; Devlin, 1998). Esta vitamina atua também do processo de cicatrização e regeneração de feridas e matriz óssea e na síntese de corticosteroides (Halver et al., 1985).

O AA é armazenado em muitos tecidos e, nos peixes, os locais de maior depósito são sangue, fígado, rins e pele (Halver, 1972; Tucker & Halver, 1984). As concentrações nestes órgãos podem relacionar-se diretamente com sua atividade metabólica, como também com os níveis de ácido ascórbico da dieta (Hilton et al., 1978; Tucker & Halver, 1984; Robbins et al., 1986; Chagas et al., 2003).

O ácido ascórbico pode ser sintetizado pela maioria dos mamíferos e aves, pelos reptéis, anfíbios, esturjões e peixes pulmonados, que apresentam a enzima L-gulonolactona oxidase (GLO), que catalisa o último passo da transformação do ácido glicurônico em ácido ascórbico. Várias espécies, incluindo invertebrados, peixes teleósteos, primatas, porco da Índia, morcegos, algumas aves e o homem, não exibem esta enzima (Figura 2), sendo dependentes, portanto, da quantidade dietética ingerida (Chatterjee et al., 1975; Dabrowski, 1990; Touhata et al., 1995).

Fracalossi et al. (2001) estudaram a capacidade de síntese do ácido ascórbico, verificada pela presença da atividade da enzima L-gulonolactona oxidase (GLO), em oito ordens de peixes pertencentes à bacia Amazônica. A arraia de água doce *Potamotrygon* sp. e o peixe pulmonado sulamericano *Lepidosiren paradoxa*, peixes não teleósteos, foram os únicos que demonstraram atividade de GLO. Em adição, Mesquita-Saad (2001) descreveu uma variação sazonal nos níveis de ácido ascórbico em tambaquis que pode estar relacionado às oscilações no nível da água dos rios, o que reflete a disponiblidade de alimento e, portanto, de vitamina C.

No ambiente natural, a principal fonte de ácido ascórbico é o plâncton e outros alimentos naturais, muitas vezes ausentes ou pouco disponíveis em criação intensiva, sendo necessária a suplementação exógena na alimentação.
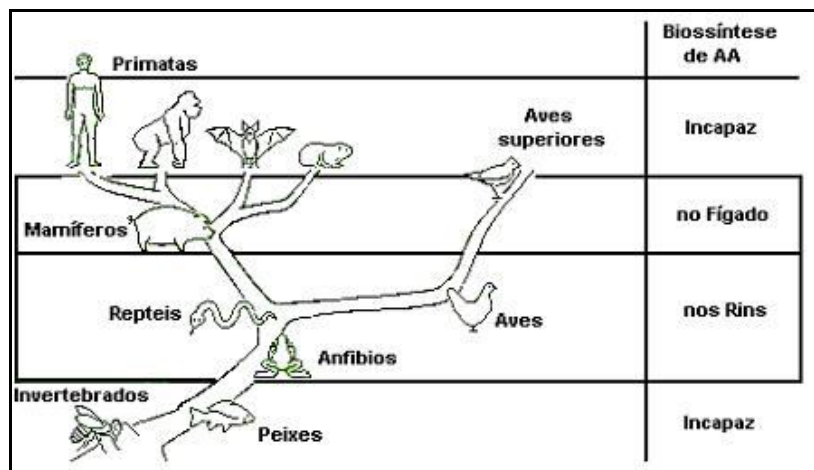
Figura 2. Evolução da síntese de ácido ascórbico nos animais. Chatterjee (1973).

A deficiência de AA nos peixes pode provocar redução do crescimento, aumento da mortalidade, deformações ósseas (lordose, escoliose e cifose), exoftalmia, edemas, perda do apetite, fragilização do sistema capilar, deformações branquiais, hemorragias, anorexia, movimentos convulsivos, irritabilidade, erosão da nadadeira caudal (Figura 3), letargia, empalidecimento das brânquias, deformidades operculares e nas lamelas brânquiais, escurecimento da pele, aumento do estresse e redução da resposta imune (Mahajan & Agrawal, 1980; Navarre & Halver, 1989; Teskeredzic et al., 1989; Halver, 1995; Martins, 1995; Lee et al., 1998; Gapasin et al., 1998; Moreau & Dabrowski, 2000; Dabrowski, 2001; Fujimoto & Carneiro, 2001; Chagas & Val, 2003; Chagas et al., 2003; Chagas & Val, 2006; Koshio, 2007).

Figura 3. Carpa alimentada com dieta deficiente em AA, demonstrando deformação da coluna. Pilarski (2004).

Utilização de revestimentos e derivados químicos de ácido ascórbico

Quando se trata de adição de ácido ascórbico em alimentos para organismos aquáticos, um dos grandes problemas enfrentados é a instabilidade desta vitamina, que devido à labilidade em altas temperaturas e propensão à oxidação, acaba se perdendo durante o processamento e estocagem da ração (Fracalossi et al., 1998).

O ácido L-ascórbico na forma cristalina, seca e pura, é razoavelmente estável. Entretanto, é facilmente oxidado em condições neutras ou alcalinas, onde o oxigênio, a umidade, os microelementos, a temperatura elevada, a luz e os lipídios promovem sua oxidação e destruição (O'Keefe, 2001). Por estas razões, perdas dessa vitamina podem ocorrer durante o processo de industrialização ou o armazenamento prolongado das rações (Tacon, 1991). Shiau & Hsu (1993) demonstraram que 75% da quantidade inicial de AA acrescentado em uma dieta para organismos aquáticos pode ser perdida durante o processamento e estocagem da ração em temperatura ambiente, em uma hora.

Os métodos de processamento e armazenamento que removem o oxigênio reduzem o calor e evitam o contato com ferro, cobre e outros metais, aumentam significativamente a retenção da atividade de vitamina C nas rações. Entretanto, a estabilidade efetiva do ácido ascórbico foi alcançada somente com a proteção física ou química dos agentes oxidantes (Rotta, 2003). Um dos principais métodos de proteção física é a encapsulação do ácido ascórbico puro.

Os derivados do ácido ascórbico mais recentemente desenvolvidos para utilização em rações destinadas a organismos aquáticos são formados por ésteres de fosfato como o ascorbil monofosfato (AMP) e o ascorbil polifosfato (AP). Estes possuem maior estabilidade e biodisponibilidade durante o processo de industrialização e estocagem do alimento seco e úmido (Lovell, 1989; Matusiewicz & Dabrowski, 1995; Andersen et al., 1998). Outro aspecto importante desses novos compostos é que eles não sofrem oxidação durante a passagem pelo trato gastrointestinal até sofrerem hidrólise e serem absorvidos nos enterócitos (Dabrowski et al., 1994).

Exigência de ácido ascórbico para os peixes

As exigências de ácido ascórbico dos peixes, como para qualquer outra vitamina, são expressas como a quantidade de atividade vitamínica necessária por kg de peso vivo por dia para atingir uma resposta fisiológica específica no organismo (Rotta, 2003). Em qualquer nível de resposta, estas exigências são afetadas pela espécie, idade, tamanho, velocidade de crescimento e estado fisiológico do peixe, como também pelas inter-relações dos nutrientes e fatores ambientais, como temperatura e presença de produtos tóxicos (Lovell, 1989; Luzzana et al., 1995; Dabrowski et al., 1996; Li & Robinson, 1999; O'Keefe, 2001; Chagas et al., 2003).

Os níveis de AA adequados para obtenção de um crescimento normal e sobrevivência em peixes são baixos (Blom & Dabrowski, 2000), entretanto, altos níveis são indicados para aumentar a resistência dos peixes ao estresse e às infecções (Li & Robinson, 1999; Chagas et al., 2003; Garcia et al., 2007).

No Brasil, poucos são os trabalhos que relatam as exigências vitamínicas para peixes tropicais (Tabela 1). Essas exigências são específicas e dependem de vários fatores ambientais e fisiológicos (Li & Robinson, 1999; Lovell, 2000), que incluem ontogenia (Woodward, 1994; Dabrowski et al., 1996), reprodução (Blom & Dabrowski, 1995) e função metabólica (Blom & Dabrowski, 1995; Gouillou-Coustans et al., 1998).

Tabela 1. Exigências por ácido ascórbico para o crescimento de peixes cultivados.

Espécie	Exigência (mg kg^{-1} dieta)	Referência
Oreochromis aureus	50	Lim & Klesius (1997)
Oreochromis niloticus x *O. aureus*	79	Shiau & Jan (1992)
Oreochromis niloticus	420	Soliman et al. (1994)
Astronotus ocellatus	25	Fracalossi et al. (1998)
Pterophylum scalare	360	Blom & Dabrowski (2000)
Colossoma macropomum	100	Chagas & Val (2003)
Piaractus mesopotamicus	139	Martins et al. (1995)
Pseudoplatystoma corruscans	500	Fujimoto & Carneiro (2001)
Brycon amazonicus	800	Affonso et al. (2007)

Fujimoto & Carneiro (2001) demonstraram que a suplementação de dietas com 500 mg de vitamina C kg^{-1} de ração é suficiente para o bom desempenho produtivo e para prevenir a infestação e a ocorrência de deformidades em alevinos de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) em fase de crescimento.

Em larvas de tilápia do Nilo, Toyama et al. (2000) observaram que a sobrevivência das larvas foi maior quando estas receberam dietas suplementadas com vitamina C acima de 200 mg kg^{-1} de ração e a sobrevivência média estimada foi de 61,6% a 67,9%.

Chagas & Val (2003) avaliaram o efeito da suplementação dietética com ácido ascórbico no ganho de peso e em parâmetros hematológicos do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e observaram que os animais alimentados com maiores níveis de ascorbato (100 e 500 mg kg^{-1}) mostraram pesos corpóreos maiores, melhores taxas de conversão alimentar e sobrevivência. A ausência de ácido L-ascórbico na ração, além de causar redução nos valores de hematócrito e no número de eritrócitos, que caracteriza anemia, provocou aumento no volume corpuscular médio, na hemoglobina corpuscular média e na concentração de hemoglobina corpuscular média. Esses resultados revelam a importância do ácido L-ascórbico na dieta dos juvenis de tambaqui e o nível de 100 mg AA kg-^{1} de ração é adequado, garantindo bom ganho de peso e manutenção da homeostase do organismo.

Affonso et al. (2007) avaliaram o efeito de altos niveis dietéticos de AA (400, 500, 600 e 800 mg AA kg^{-1}) sobre a condição fisiológica da matrinxã. Os peixes alimentados com 800 mg AA kg^{-1} apresentaram maior ganho de peso e sobrevivência. Foi observado também aumento no hematócrito (Ht),

hemoglobina (Hb) e número de eritrócitos (RBC) quando da suplementação dos níveis de 600 e 800 mg AA kg^{-1}. Os valores de leucócitos totais e proteínas plasmáticas foram significativamente maiores nos peixes suplementados com AA. Considerando o perfil fisiológico e a desempenho produtivo dos peixes, os autores sugeriram a suplementação de 800 mg AA kg^{-1} para matrinxã.

Em estudo que avaliou a interação entre diferentes níveis de AA (0,125, 375 e 1115 mg/kg^{-1}) e ferro (30, 90 e 270 mg/kg^{-1}), Barros et al. (2002) observaram que a ausência desses nutrientes na alimentação de tilápia do Nilo propiciou o aparecimento de anemia microcítica e hipocrômica, enquanto a presença da vitamina em dosagens elevadas estimulou a liberação de eritrócitos imaturos na corrente sangüínea. Determinou-se, também, que níveis desses nutrientes acima das exigências nutricionais descritas para a espécie não produziram efeito detrimental no desempenho produtivo, na produção de proteínas plasmáticas ou na morfologia do fígado.

Influência da suplementação dietética com ácido ascórbico na resistência ao estresse e enfermidades

A administração de dietas enriquecidas com ácido ascórbico tem se mostrado benéfica na prevenção dos efeitos negativos do estresse e no bom funcionamento do sistema imune, com aumento da sobrevivência dos peixes (Waagbo, 1994; Fletcher, 1997; Verlhac et al., 1998; Chagas et al., 2003). O AA atua no sistema imune, tanto celular, relacionado à proliferação de neutrófilos (Combs, 1992) e aumento da migração de macrófagos (Lim et al., 2000), quanto na humoral, atuando no estímulo à produção de interferons que protegem a célula contra antígenos (Combs, 1992). Os linfócitos e neutrófilos seriam as principais células de defesa influenciadas pelo AA, de acordo com Martins et al. (1995) e Wahli et al. (1998).

O AA e os aminoácidos sulfurados são necessários para a deposição de fibrina, colágeno e polissacarídeos dentro dos vacúolos formados para isolar o microrganismo patogênico invasor pelos lisossomos (organela membranosa que contém diversos tipos de enzimas hidrolíticas, coadjuvantes no processo de digestão intracelular e de organismos exógenos). Desse modo, dietas deficientes em AA podem inibir o processo de vacuolização (Wedemeyer, 1997).

Henrique et al. (1998) analisaram a influência do ácido ascórbico sobre as respostas fisiológicas de *Sparus aurata* submetido à hipóxia por 24 horas. Após 3 horas de estresse, ocorreu hiperglicemia nos peixes de todas as dietas experimentais (25, 50, 100 e 200 mg AA/kg^{-1}), mas foi mais evidente nos peixes alimentados com dietas isentas desta vitamina. A deficiência de AA, em *I. punctatus*, ocasionou maior suscetibilidade da espécie à toxicidade por amônia e ao estresse hipóxico (Mazik et al., 1987).

Em tambaqui, Chagas & Val (2006) observaram a influência do AA na resistência da espécie ao estresse hipóxico. Os peixes que receberam altos niveis de AA (500 mg kg^{-1}) na dieta não exibiram mudanças no pH eritrocitário e na glicose plasmática, sendo observada também redução dos níveis de peroxidação lipídica. A suplementação de AA foi capaz de reduzir os efeitos negativos da exposição à hipoxia aguda em juvenis de tambaqui.

Abreu & Urbinati (2006) avaliaram a participação do AA (0, 100, 200, 400 e 800 mg kg^{-1}) em indicadores de estresse em matrinxã (*Brycon amazonicus*) durante exposição aérea dos peixes e concluiram que a aplicação desse estressor por 2 minutos provocou alterações hematológicas, hormonais, metabólicas e eletrolíticas nos peixes, mas que o AA, nos níveis e tempo de administração avaliados, não foi capaz de minimizar as respostas de estresse. Segundo Dabrowska et al. (1991), as mudanças no nível de cortisol em peixes relacionadas ao estresse são independentes da dose de AA fornecida. Entretanto, Pilarski (2006) observou que a suplementação dietética com vitamina C promoveu redução de cortisol plasmático e aumento de células de defesa orgânica em tilápia do Nilo.

A suplementação dietética com AA (0,2%) e níveis elevados de proteína em *Channa punctatus* expostos a concentrações subletais do pesticida endosulfan, mitigou os efeitos negativos da toxicidade do pesticida, melhorando o crescimento e a sobrevivência dos peixes. Isto possivelmente ocorreu devido à propriedade antioxidante da vitamina C, baseada na capacidade de reagir com radicais livres durante o estresse (Sarma et al., 2009).

Tewary & Patra (2008) observaram, em experimento realizado com *Labeo rohita*, alta qualidade de carcaça em peixes alimentados com dietas suplementadas com elevados níveis de vitamina C (1000 mg/kg^{-1}), possivelmente devido às propriedades antioxidantes da vitamina e sua capacidade de prevenir a peroxidação dos ácidos graxos insaturados. Os autores observaram também que os parâmetros imunes não específicos (atividade fagocítica e “burst” respiratório) foram estimulados em peixes suplementados com mega doses de AA, aumentando conseqüentemente a proteção contra a bactéria *Aeromonas hydrophila*.

Em estudo com a espécie *Takifugu rubripes*, Eo & Lee (2008) estimaram que dietas suplementadas com 29 mg AA kg^{-1} de ração promoveram um bom desempenho produtivo e a manutenção da homeostase dos peixes. Em adição, a atividade da enzima mieloperoxidase, uma importante enzima com atividade microbicida, foi maior nos peixes que receberam dietas suplementadas com AA. De forma semelhante, Kumari & Sahoo (2006), que determinaram a atividade desta enzima em Asian catfish (*Clarias batrachus*) e observaram melhora na atividade fagocítica dos peixes alimentados com dietas suplementadas com AA.

Aumento da resistência à infecção por *Edwardsiella tarda* e *E. ictaluri* em *I. punctatus* (Durve & Lovell, 1982; Li & Lovell, 1985), por *Vibrio anguillarum* em *Oncorhynchus mykiss* (Navarre & Halver, 1989) e por *Aeromonas salmonicida* e *Vibrio salmonicida* em *S. salar* (Erdal et al., 1991; Hardie et al., 1991; Thompson et al., 1993) foi observado quando da suplementação de AA na dieta dos peixes.

No entanto, no caso de *I. punctatus* expostos à infecção por *E. ictaluri,* Li et al. (1998) observaram que megadoses de vitamina C na dieta não provocaram aumento de resistência a doenças ou efeito significativo na produção de anticorpos depois da exposição ao patógeno e concluíram que a concentração de 50 mg AA kg^{-1} foi adequada para o crescimento normal, resposta ao estresse e resistência a doenças.

Lin & Shiau (2005), reportaram que a suplementação dietética com AA aumentou a resposta imune não específica de *E. malabaricus*, incluindo

aumento da produção de O_2, da atividade do sistema complemento e da lisozima. Os mesmos autores também observaram maior sobrevivência dos peixes alimentados com a dieta suplementada com 288 mg AA kg^{-1} após exposição à bactéria *Vibrio carchariae* em relação aos peixes alimentados com dieta isenta desta suplementação.

Considerando a ação desta vitamina nos mecanismos não específicos de defesa, Wahli et al. (2003) observaram histologicamente, em *O. mykiss*, que a cicatrização estava diretamente relacionada à quantidade de AA presente na dieta. Além disso, aumento no índice fagocítico foi observado por Roberts et al. (1995) em *Scophthalmus maximus* e por Johnson & Ainsworth (1991) em *I. punctatus*.

Para a *Anguilla japonica*, a suplementação superior a 27 mg AA/kg^{-1} resultou em maior atividade bactericida e a inclusão de 645 mg kg^{-1} ou mais provocou aumento do hematócrito, hemoglobina, proteína total e níveis de vitamina C no fígado e cérebro (Ren et al., 2005).

Redução de infestação de peixes por parasitas está relacionada à suplementação dietética com vitamina C. Martins (1998) observou significativa diminuição no número de *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea) nas brânquias de *P. mesopotamicus* alimentados com 200 mg AA kg^{-1} de ração durante 24 semanas. Uma redução da infestação por ectoparasitas também foi observada em larvas de tilápia do Nilo na fase de reversão sexual. Leonardo et al. (1998) verificaram diferenças na porcentagem de *Trichodina* sp. e Monogenea na proporção de 21,9%; para larvas alimentadas com dieta isenta de AA e apenas 3,1% nas suplementadas com 1700 mg AA/kg^{-1} de ração. Em outro estudo, Leonardo (1999) relataram a ocorrência de 72,5% de *Trichodina* sp. em peixes alimentados com dieta isenta de AA e 52,5% em peixes alimentados com dieta suplementada com 1000 mg AA kg^{-1}.

A utilização de vacinas na aqüicultura torna-se cada vez mais importante, pois além de proteção imunológica elas aumentam a taxa de crescimento e promovem boa eficiência na conversão alimentar (Grove et al., 2003). Com esse intuito, Pilarski (2006) estudou o efeito da suplementação com vitamina C na eficácia de uma vacina atenuada para a bactéria *Flavobacterium columnare* injetada intraperitonealmente em tilápias do Nilo e concluiu que a administração de 500 mg AA/kg^{-1} de ração, na forma ascorbil polifosfato, potencializou o efeito da vacina (Figura 4), pois mitigou os efeitos nocivos do estresse, principalmente contribuindo para a redução de cortisol plasmático e aumento de células de defesa orgânica.

Figura 4. Tilápia do Nilo alimentadas com dieta suplementada com 500 mg kg^{-1} de vitamina C e vacinada contra *F. columnare* (**A**) e sem suplementação com vitamina C e desafiada com a mesma bactéria. Animal apresentando corrosão nas nadadeiras caudal e lateral, isquemia, exoftalmia e escurecimento corporal (**B**). Pilarski (2004).

b) Vitamina E

A vitamina E (alfa-tocoferol) (Figura 5) é lipossolúvel e constitui a primeira linha de defesa dos sistemas biológicos. Protege as membranas dos compostos oxidáveis do citoplasma celular, promovendo a estabilização dos ácidos graxos insaturados e quebrando as cadeias de peróxidos, que podem provocar danos aos componentes intracelulares, incluindo membranas, ácidos nucléicos e enzimas, e desencadear enfermidades diversas (Waagbo, 1994). A vitamina E também protege os lipídios da oxidação (Thakur & Srivastava, 1996) e aumenta a absorção de vitamina A (Conn & Stumpf, 1984).
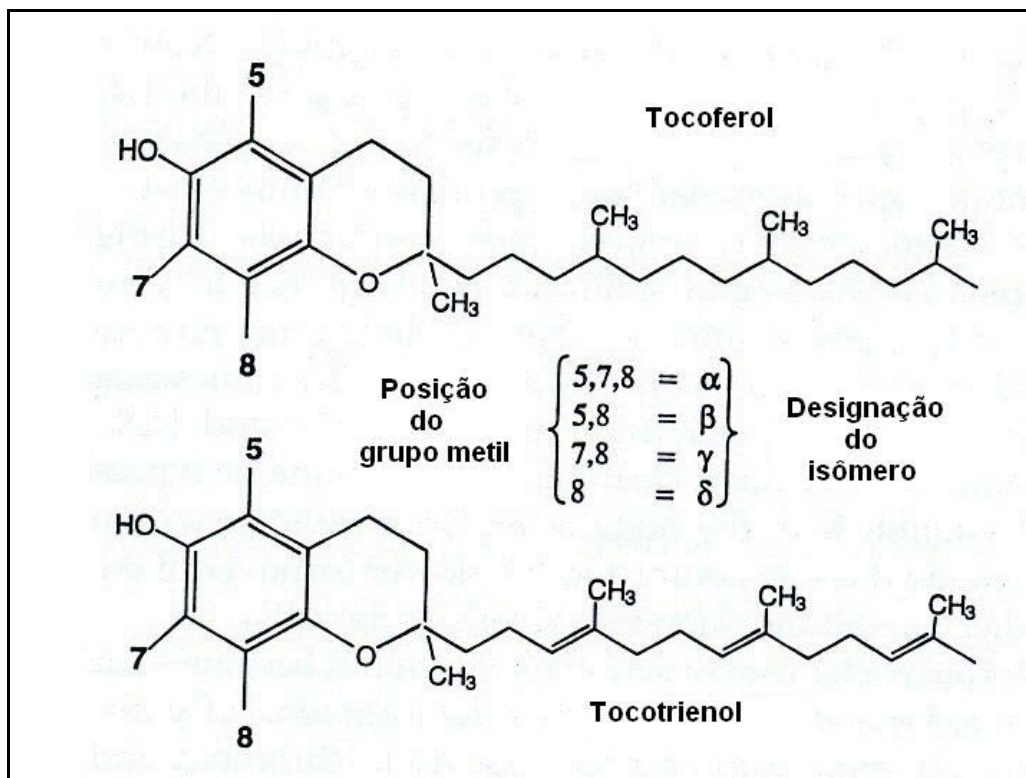
Figura 5. Estrutura da vitamina E.

Na natureza são encontradas oito moléculas de vitamina E com estruturas diferentes. Quatro moléculas de tocoferol (∝, β, δ e γ) e quatro moléculas de tocotrienol (∝, β, δ e γ), que diferem entre si pela localização do grupo metil do anel aromático de sua cadeia molecular (Devlin, 1998). Todas essas moléculas possuem atividade antioxidante, todavia o ∝-tocoferol é quimicamente e biologicamente o mais ativo (Schneider, 2005).

O ∝-tocoferol é um potente antioxidante biológico, que reage com o radical peroxil ácido graxo, produto primário da peroxidação lipídica, interceptando a reação em cadeia e protegendo, assim, as membranas biológicas e os compostos lipídicos contra o ataque dos radicais livres (Huang & Huang, 2004).

As formas esterificadas do ∝-tocoferol (acetato, sucinato, nicotinato ou fosfato), comumente presentes em suplementos dietéticos, são hidrolizadas pela enzima pancreática carboxil éster hidrolase no intestino (Figura 6), numa reação bile-ácido-dependente (Schneider, 2005). Após a ingestão e absorção gastrointestinal, a vitamina E é distribuída pelo sangue para os tecidos (Blatt et al., 2001).
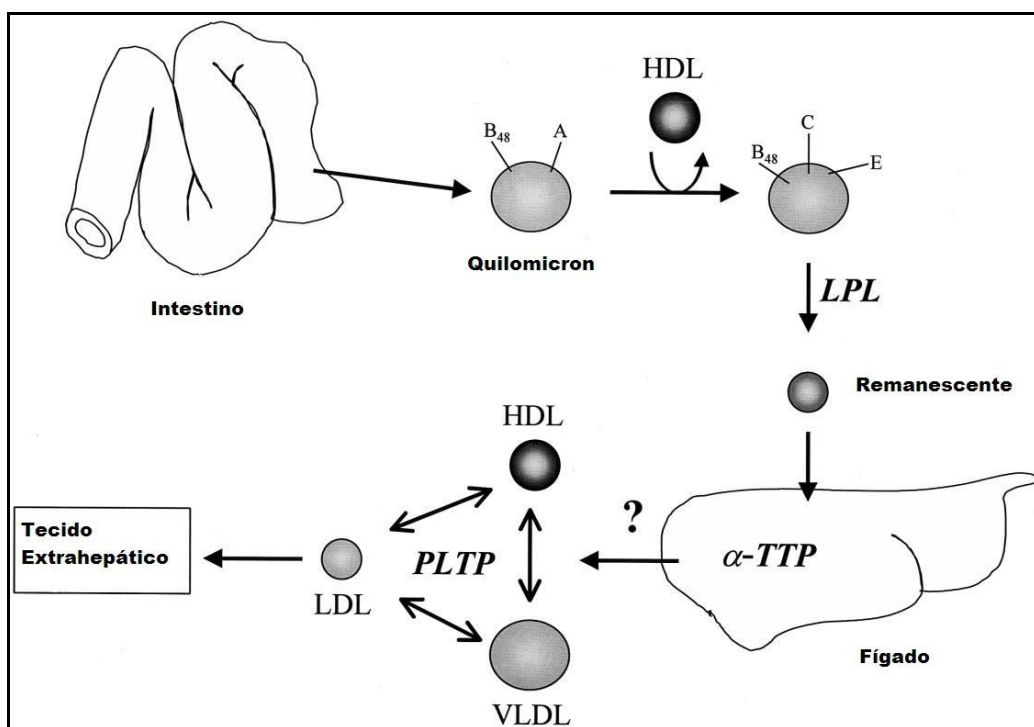
Figura 6. Absorção, transporte e distribuição do tocoferol. Azzi & Stocker (2000).

Durante o processo de oxidação provocado pelos ácidos graxos, o tocoferol forma radicais tocoferil, os quais são novamente reduzidos por outros antioxidantes, principalmente o ácido ascórbico (em meio aquoso) e a ubiquinona (meio lipofílico). Com a deficiência de ambos antioxidantes, os radicais de tocoferol desempenham a função de agente oxidante, efeito antagônico a de pró-oxidante (Bowry et al., 1992).

O ɑ-tocoferol demonstra moderada atividade anticoagulante. A tocoferilquinona é um potente anticoagulante e um inibidor de vitamina K dependente da carboxilase, que controla a coagulação sanguínea (Dowd & Zheng, 1995).

O tocoferol natural sofre perdas substanciais de sua atividade nos alimentos processados ou armazenados (Lovell, 1998), aceleradas principalmente pelo calor. Porém, desde a esterificação de vitaminas, houve uma melhora em sua estabilidade, e suplementos comerciais usualmente contêm acetato de d-∝-atocoferil ou acetato dl-∝-atocoferil (McDowell, 1989).

A vitamina E é utilizada na suplementação de dietas com a finalidade de estimular o crescimento, a resistência ao estresse e o sistema imune dos peixes. Também pode ser eficiente na conservação do pescado durante o processamento e estocagem, inibindo a degradação dos lipídios pela oxidação

(Lim & Webster, 2001). Sua deficiência causa perda do apetite, redução do crescimento, exoftalmia, ascite, escurecimento da superfície corporal, anemia, brânquias pálidas e disformes, encurtamento do opérculo, distrofia muscular, prejuízo à produção de eritrócitos, menor resposta de anticorpo, despigmentação e acúmulo de gordura no fígado (Tacon, 1992; Bai & Lee, 1998). Cortes histológicos de musculatura de peixes alimentados com dieta isenta de vitamina E revelaram fibras atrofiadas, necrosadas e com infiltrado inflamatório de leucócitos no tecido conectivo (Chen et al., 2004).

A concentração de α-tocoferol nos tecidos também pode ser afetada significativamente pela sua quantidade na ração. Existe uma correlação linear entre o aumento da deposição de vitamina E nos tecidos e o aumento do nível de sua suplementação na dieta, até posterior saturação (Galvin et al., 1998). Já em situações de deficiência desta vitamina, o fígado disponibiliza a vitamina E armazenada nos tecidos. Isso compromete a integridade estrutural dos lipídios que compõem a membrana celular e facilita o seu rompimento, que é caracterizado pelo escurecimento do tecido (Meydani et al., 2005).

As exigências de vitamina E para o crescimento dos peixes são apresentadas na Tabela 2. Essas exigências aumentam quando há um aumento na ingestão de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) (Watanabe et al., 1981; Hamre & Lie, 1995; Shiau & Shiau, 2001), como observado em tilápia do Nilo, cuja exigência por vitamina E variou entre 42-44 mg/kg^{-1} e 60-66 $mg\ kg^{-1}$ quando a dieta tinha em sua composição 50 e 120 g lipídios, respectivamente (Shiau & Shiau, 2001). Para tilápia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*), a exigência por vitamina E foi de 62,5 UI kg^{-1} quando a dieta continha 12% de óleo oxidado (Huang & Huang, 2004). Esse maior nível de vitamina E nas dietas é explicado pela sua capacidade de proteger os ácidos graxos poliinsaturados durante sua absorção e metabolismo (Huang et al., 2004).

Tabela 2. Exigência de vitamina E para o crescimento de peixes cultivados.

Espécie	Exigência (mg/kg^{-1})	Referência
Salmo salar	30	NRC (1993)
Ictalurus punctatus	50	Wilson et al. (1984)
Cyprinus carpio	200-300	Watanabe et al. (1977)
Oncorhynchus mykiss	100	Watanabe et al. (1981)
Oreochromis niloticus	50-100	Satoh et al. (1987)

A interação da vitamina E da dieta com o sistema antioxidante dos peixes foi observada por Tocher et al. (2002). Uma menor quantidade de vitamina E na dieta reduziu os níveis da vitamina nos músculos e aumentou a atividade oxidante do organismo, produzindo altos níveis de peróxidos lipídicos. Gatlin III et al. (1992) encontraram resultados similares,

observando que a suplementação de vitamina E, em níveis acima de 240 mg/kg^{-1}, na dieta aumentou a concentração de tocoferol nos tecidos e proporcionou menor oxidação lipídica após processamento.

Otani (2009) avaliou a influência da suplementação com vitamina E (100 mg/kg^{-1}) na qualidade de filés congelados de tilápia submetidas a dois métodos de abate (imersão em gelo e sangria). A suplementação dietética com vitamina E não interferiu no desempenho produtivo dos animais, todavia, influenciou positivamente a composição centesimal e a oxidação lipídica, protegendo os filés durante o período de estocagem.

Baker & Davies (1996) observaram que o crescimento do bagre africano *Clarias gariepinus* foi reduzido quando os lipídios da dieta foram oxidados. A adição de vitamina E nas dietas rancidificadas aumentou significativamente o crescimento dos peixes.

A deficiência de vitamina E em peixes tem sido associada à baixa resistência a agentes estressores, rápida elevação do cortisol, alterações hematológicas e imunes e redução do crescimento (Montero et al., 2001; Chen et al., 2004; Belo et al., 2005). Montero et al. (1998) verificaram que *Sparus aurata* alimentados com dietas contendo baixos teores de vitamina E (18,5 mg/kg^{-1}) tinham níveis plasmáticos mais elevados de cortisol, quando comparados com peixes arraçoados com dietas suplementadas com 167,5 mg kg^{-1} de vitamina E.

Zhong et al. (2007) estudaram o efeito de dietas suplementadas com lipídios oxidados e vitamina E em salmões do Atlântico. Os autores relataram que o óleo oxidado provocou deficiência de vitamina E em alguns tecidos de peixes alimentados com dieta deficiente desta vitamina. Relataram também que a mistura de tocoferol (δ e γ) desempenhou um bom papel antioxidante para o salmão, embora menos efetiva que o α-tocoferol em muitos tecidos, com exceção dos músculos, onde o δ e γ tocoferol foram depositados em níveis mais elevados.

A suplementação com vitamina E em níveis acima do recomendado é sugerida para incrementar as funções do sistema imune e conseqüentemente a resistência a doenças (Clerton et al., 2001). Em truta arco-íris, a suplementação de 295 mg de vitamina E/kg^{-1} promoveu um aumento significativo da fagocitose pelos leucócitos isolados do intestino e os autores sugeriram que o efeito da vitamina E parece ser maior sobre a resposta local (intestino) do que sobre as respostas sistêmicas (rim anterior) (Clerton et al., 2001).

Lin & Shiau (2005) estudaram o efeito de dietas suplementadas com seis níveis de tocoferol (0, 25, 50, 100, 200, 400 e 800 de mg/kg^{-1}) e dois níveis de lipídios (4 ou 9%) sobre a resposta imune de garoupas *Epinephelus malabaricus*, e concluíram o que a suplementação com tocoferol foi essencial para o crescimento normal da espécie em estudo. A suplementação com 200-400 mg/kg^{-1} de tocoferol e 4 ou 9% de lipídios, resultou em uma melhor resposta imune dos peixes (maior número de células de defesa orgânica, "burst" respiratório de leucócitos, atividade da lisozima e do sistema complemento), sugerindo que níveis elevados desta vitamina contribuem mais para a manutenção da imunidade do que para o crescimento. Resultados similares foram observados no *Sparus aurata* (Ortuño et al., 2000; Cuesta et al., 2001).

Vários autores relatam que a suplementação dietética com a vitamina E em peixes auxilia na resposta inflamatória por aumentar expressivamente a quantidade de células de defesa e na prevenção da imunossupressão em resposta a estímulos estressores (Ortuño et al., 2000; Belo et al., 2005; Martins et al., 2008). Dietas suplementadas com 450 mg kg^{-1} de vitamina E reduziram os níveis plasmáticos de cortisol em pacu, favorecendo o acúmulo de macrófagos e a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo da espécie (Belo et al., 2005).

Iwashita (2008) estudou a influência da suplementação dietética com vitamina E na cinética do processo cicatricial induzido em tilápia do Nilo e verificou que o índice de retração cicatricial foi significativamente maior no grupo suplementado, fato atribuído à contribuição do maior número de células inflamatórias, células mucosas, cromatóforos e à maior produção e organização das fibras de colágeno que foram significativamente maiores nos diferentes tempos. Os resultados indicam que o efeito nutricêutico da vitamina E promove o processo de reparação tecidual em tilápia do Nilo.

Interação das vitaminas C e E

A interação das vitaminas C e E aparentemente ocorre no âmbito celular, entre a membrana e o citosol (Shiau & Hsu, 2002). A vitamina C possui a capacidade de reciclar a vitamina E, partindo dos radicais oxidados do tocoferol (Ji et al., 2003). Supõe-se que o α-tocoferol tenha sua cadeia fitil posicionada na região interna da membrana, na parte hidrofóbica, enquanto o grupo OH (reativo e polar) reside próximo ou junto à superfície da membrana celular, ficando acessível aos componentes solúveis em água, como o ácido ascórbico, o qual pode reduzir o radical α-tocoferol, pela doação de um H para um peróxido de lipídio, formando um radical ascorbil e um radical α-tocoferol (Okamura, 2007). Dessa forma, a adição de vitamina C inibe a perda do α-tocoferol presente nas membranas, retardando a oxidação dos lipídios e protegendo as membranas celulares (Hamre et al., 1997; Ortuño et al., 2001).

As vitaminas C e E estão envolvidas no aumento das respostas imunes específica e não-específica (Wahli et al., 1998; Ortuño et al., 2001; Shiau & Hsu, 2002; Puangkaew et al., 2004), prevenindo a imunosupressão (Waagbo, 1994; Montero et al., 1999; Belo et al., 2005), aumentando o “burst respiratório” (Waagbo, 1994; Ortuño et al., 2001), auxiliando na resposta inflamatória (Belo et al., 2005; Reno et al., 2005; Bozzo, 2007) e melhorando a atividade fagocítica (Ortuño et al., 2001; Sahoo & Mukherjee, 2002; Puangkaew et al., 2004).

Em pirarucus *Arapaima gigas* criados em tanques-rede durante 45 dias, a eficácia da suplementação dietética das vitaminas C e E em respostas fisiológicas foi avaliada. Os peixes que receberam a suplementação de vitamina C (800mg de kg^{-1} de ração) e vitaminas C+E (800 mg e 500 de mg/kg^{-1} de ração, respectivamente) apresentaram maior ganho de peso, sobrevivência, aumento no hematócrito, concentração de hemoglobina e número de eritrócitos. A suplementação de vitamina E ocasionou ainda redução do número de trombócitos totais, linfócitos e neutrófilos, além de aumentar os níveis de glicose e os eosinófilos (Menezes et al., 2006).

Andrade et al. (2007) avaliaram a influência da suplementação das vitaminas C e E (500, 800 e 1200 mg/kg^{-1}) em parâmetros sangüíneos do pirarucu e observaram que o ganho de peso e mortalidade não foram afetados nem pelo tipo de vitamina ou pela sua concentração. Em adição, a suplementação das vitaminas C e E resultou no aumento significativo do número de eritrócitos (800 e 1200 mg AA kg^{-1}), de leucócitos (500-1200 mg de AA/kg^{-1}) e de proteínas totais (todos os níveis de vitamina E e C, com exceção de 500 mg AA/kg^{-1}). Ainda, um aumento da glicose plasmática foi observado nos peixes suplementados com 800 ou 1200 mg de vitamina E kg^{-1} da dieta. Esses resultados sugerem que os níveis de 800 e 1200 mg AA/kg^{-1} de dieta são adequados para o pirarucu e que os altos níveis de vitamina E não são necessários para aumentar o número de leucócitos na espécie.

Ortuño et al. (2001) observaram em *Sparus aurata*, que a suplementação com as vitaminas C e E promoveu aumento da atividade fagocitária de leucócitos no rim anterior. Por outro lado, Sealey & Gatlin III (2002), ao oferecerem ao híbrido *Morone chrysops* x *M. saxatilis* suplementação com megadoses de vitaminas C e E na ração, verificaram ineficácia contra infecção experimental com *Streptococcus iniae*. Observa-se, algumas vezes, que megadoses podem não surtir efeito sobre o organismo.

A eficácia da combinação das vitaminas C e E na dieta de *Oncorhynchus mykiss* foi avaliada por Wahli et al. (1998). Altas doses de vitamina C (2.000 mg kg^{-1}) e E (800 mg kg^{-1}) diminuíram a mortalidade em peixes infectados com *Yersinia ruckeri* e *Ichthyophthirius multifiliis*. Em adição, a atividade do sistema complemento e a porcentagem de trombócitos de *Notemigonus crysoleucas* foi decorrente da interação das vitaminas C e E, e a melhor combinação destas vitaminas foi de 98 a 222 mg AA/kg-^{1} com 38 mg vitamina E/kg^{-1} da dieta (Chen et al., 2004).

De forma semelhante, Garcia et al. (2007) estudaram a resposta hematológica de pacus *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas suplementadas com as vitaminas C e E e desafiados com *Aeromonas hydrophila.* Os autores analisaram o perfil hematológico, a ocorrência de sinais clínicos e a taxa de mortalidade dos peixes. Embora a suplementação com as vitaminas C e E não tenha diminuído a taxa de mortalidade dos peixes frente ao desafio com a bactéria, concluiu-se que para peixes criados em sistema intensivo, em que a principal fonte de nutrientes é oriunda da ração, a suplementação com as vitaminas C e E assume grande importância. De acordo com as respostas hematológicas, para juvenis de pacus, os níveis das vitaminas C e E recomendados são 500 e 250 mg/kg^{-1} de ração, respectivamente.

Martins et al. (2008) observaram que tilápias do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com as vitaminas C e E (500 mg/kg^{-1} de ambas as vitaminas) por 30 dias mostraram aumento no número de células no foco inflamatório, quando comparados aos não suplementados, após injeções de carragenina e LPS. A suplementação vitamínica promoveu maior acúmulo de células de defesa (leucócitos e trombócitos) na bexiga natatória após o estímulo inflamatório, mais uma vez ressaltando os efeitos benéficos da suplementação vitamínica para o sistema imune dos peixes.

A associação da vitamina C e E também promove efeitos positivos em ovos de peixes. Furuita et al. (2009) investigaram o efeito da injeção destas vitaminas nos ovos de enguia japonesa *Anguilla japonica* nos estágios inicial

e final de maturação e concluíram que a injeção, de ambas as vitaminas, promoveu maior sobrevivência e normalidade das larvas, demonstrando que a injeção vitamínica, durante o processo de maturação artificial de ovos de enguia japonesa aumenta a quantidade de vitamina nos ovos e melhora sua qualidade.

c) Vitamina A

A vitamina A, também conhecida como retinol, é um álcool primário polietilênico e lipossolúvel (Figura 7), apresentando grande capacidade reativa (Beitune et al., 2003). O termo vitamina A é empregado para designar todos os derivados da betaionona, que possuam atividade biológica de retinol, exceto os carotenóides. Possui quatro formas ativas, tais como o retinol, o retinal (retinaldeído), ácido retinóico e o éster de retinila. O ácido retinóico é a maior forma biológica ativa da vitamina A. Estas substâncias são sintetizadas pelas plantas numa forma mais complexa, os carotenóides, os quais são clivados a all-trans-retinal e logo depois a retinol na maioria dos animais e armazenados no fígado como palmitato de retinol. Existem duas vias propostas para a clivagem oxidativa de carotenóides em vitamina A: a via intrínseca, com produção direta de retinal a partir do β-caroteno, e a extrínseca, com clivagem química não enzimática de carotenóides a carotenal (Guimarães, 2009).
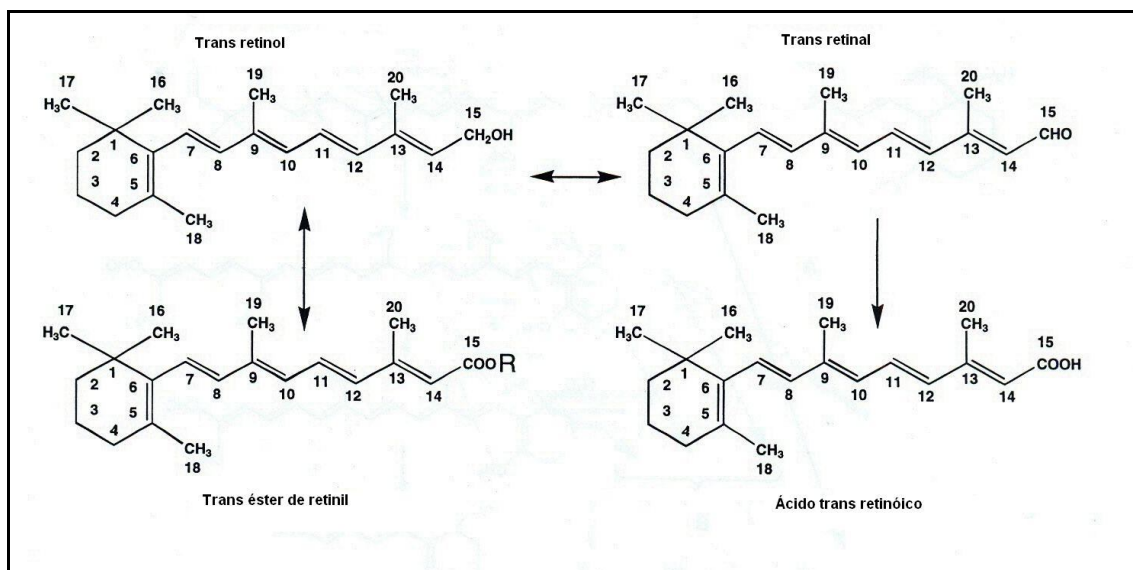
Figura 7. Estrutura da vitamina A.

Aproximadamente 50 carotenóides possuem ação biológica de vitamina A e o de maior atividade *in vivo* é o β-caroteno, um dímero do retinol. A estrutura dos retinóides é relativamente simples e cada forma molecular apresenta uma modificação no carbono da 15^a posição (C_{15}) do grupo funcional correspondente. Os retinóides que possuem ação de vitamina A são o retinol, o éster de retinila e o retinal (Saari, 1994).

No processo de digestão e absorção da vitamina A, há a participação ativa de várias enzimas. Ésteres de retinil presentes nos ingredientes de origem animal são hidrolisados no intestino pela ação da enzima pancreática (lipase triacilglicerol) e pela enzima fosfolipase B. O retinol formado é absorvido nos enterócitos na forma livre, ou associado a proteínas, que se ligam ao retinol ou a outras moléculas lipídicas (Buddington et al., 2002). Após absorção transapical, o retinol intracelular se transforma em retinol celular ligando-se a proteína tipo II (CRBPII)[2]. Os ésteres de retinol e carotenóides são incorporados a quilomicrons, que são liberados nos canais linfáticos intestinais. Parte do retinol não esterificado é absorvida via sangue, partindo da via quilomícron-linfática e exportado para o sistema circulatório (Figura 8) (Harrison, 2005).
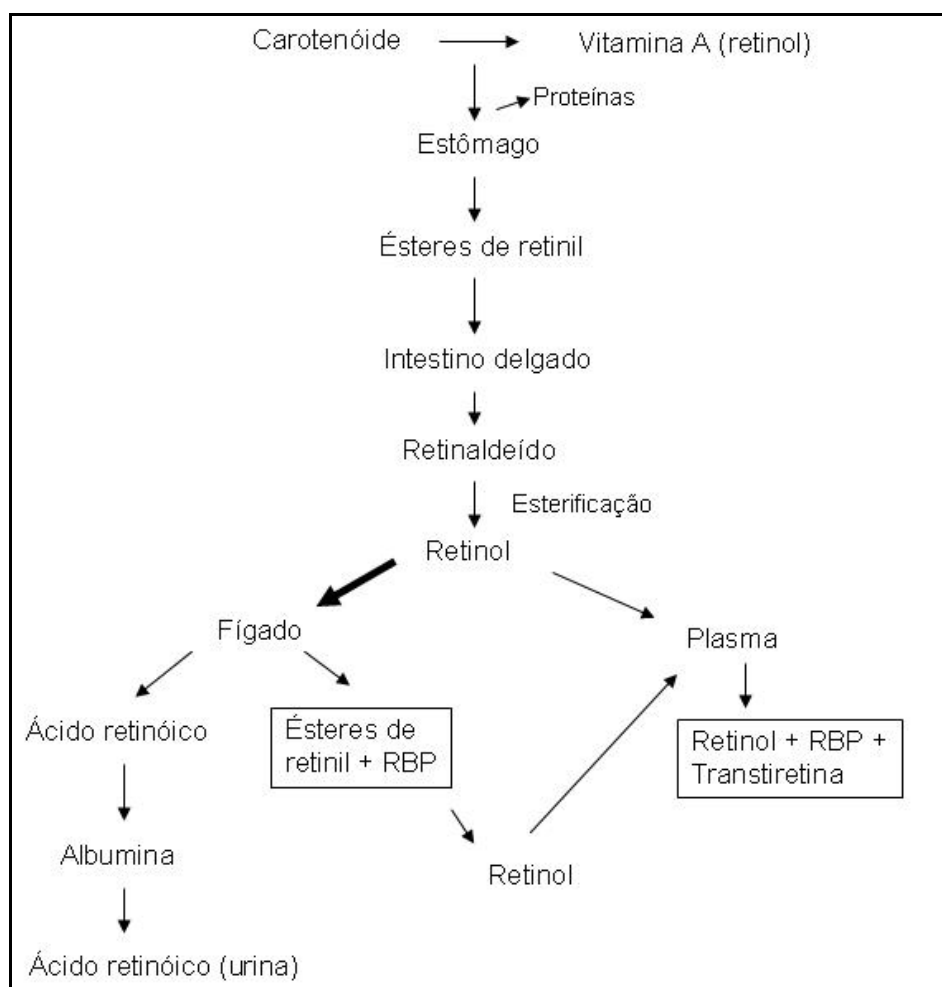
Figura 8. Metabolismo da vitamina A. Beitune et al. (2003).

Os tecidos extraem a maior parte dos lipídios e parte dos carotenóides dos quilomicrons circulantes. Após circularem pelo organismo, os quilomicrons tornam-se remanescentes e são metabolizados pelas células parenquimais do fígado. O éster de retinila é então hidrolisado a retinol antes de ser transferido para as células armazenadoras de gordura. O retinol é transportado diretamente das células parenquimais para as células armazenadoras de lipídios através dos desmossomos (Blaner & Olson, 1994). O armazenamento da vitamina A é feito sob forma de ésteres de retinil. Cerca de 50%-80% da vitamina A no corpo são estocados no fígado (Figura 7), onde a vitamina é ligada à proteína ligadora de retinol (PLR). Esse estoque regula os efeitos de variabilidade nas taxas de ingestão de vitamina A, particularmente contra os riscos de deficiência, durante os períodos de baixa ingestão dessa vitamina. A administração de pequenas quantidades de vitamina E aumenta o armazenamento do retinol nos tecidos (Beitune et al., 2003).

Quando o organismo necessita imediatamente de vitamina A, o retinol recém adquirido através da dieta pode ligar-se à proteína carreadora de retinol (RBP), produzida pelas células parenquimais, e o complexo retinol-RBP é secretado na circulação sanguínea. Na circulação, o retinol-RBP liga-se a pré-albumina, também produzida pelo fígado, formando um complexo que previne perdas da vitamina no processo de filtração dos rins (Blomhoff et al., 1991).

As diversas formas de vitamina A podem apresentar funções específicas de acordo com o tecido, órgão ou sistema orgânico. O retinal está envolvido no processo visual, o retinol é essencial no processo reprodutivo e o ácido retinóico e seus derivados modulam a expressão gênica, a diferenciação e o padrão de formação celular durante a morfogênese. A especificidade de cada etapa desses processos pode aumentar quando se considera a utilização dos isômeros *cis* ou *trans* dessas substâncias (Saari, 1994).

No caso específico dos peixes, 90% da vitamina A armazenada é encontrada no fígado e os 10% restantes estão divididos entre os olhos, plasma, gordura e aparelho reprodutivo (Katsuyama & Matsuno, 1988).

A vitamina A desempenha várias funções, principalmente na síntese de algumas glicoproteínas e glicosaminoglicanos, agindo como hormônios esteróides na regulação do crescimento e na diferenciação celular, na manutenção normal dos processos vitais e no sistema imune (Butte et al., 2002; Devlin, 2002).

O ácido retinóico é muito importante no sistema imune dos animais, pois ele é responsável por manter níveis adequados de células *natural killer* (NK) circulantes, que possuem atividade antiviral e antitumor (Zhao & Ross, 1995). Também contribui para o aumento da capacidade fagocitária de macrófagos, sendo importante no processo de diferenciação dos leucócitos. Há evidências de que esta vitamina module a resposta de células fagocitárias, estimulando a fagocitose, a ativação da citotoxicidade mediada por células e aumentando a expressão de receptores de interleucina-2 em suas células precursoras. O ácido retinóico proporciona liberação seletiva de interleucina-1 por monócitos (Trechsel et al., 1985). Adicionalmente, o ácido retinóico aumenta a porcentagem de células linfóides, que expressam marcadores de superfície de linfócitos-T auxiliares, o que sugere uma atuação diferenciada dos vários retinóides na imunidade celular, específica (Parent et al., 1984).

Esta vitamina também é componente da proteína rodopsina, um pigmento que absorve luz e é encontrada na retina dos olhos. São os carotenóides os responsáveis pela pigmentação amarelada da córnea de peixes da família dos ciclídeos de hábito diurno (Muntz, 1981). Em adição, a concentração deste pigmento é responsável pela adaptação das espécies à quantidade de luz presente nos diferentes habitats (Landolt, 1989).

Ogata & Oku (2001) alimentando *Pagrus major* com dieta suplementada com ácido retinóico (100 mg/kg) observaram o efeito da vitamina na composição corporal desta espécie. Peixes que receberam a dieta suplementada com quantidades reduzidas do ácido (10 mg/kg^{-1}) tinham peso corporal abaixo da média e os que receberam doses maiores (100 mg/kg^{-1}) deposição de lipídios superior.

A vitamina A não pode ser sintetizada pela maioria dos animais, dependendo da suplementação dietética para suprir esta necessidade. Muitos vegetais contêm compostos isoprenóides, conhecidos como carotenóides, os quais podem ser convertidos em vitamina A pela ação de enzimas específicas por difusão passiva (Blomhoff, 1994).

Alguns estudos mostram que os carotenóides são suplementos benéficos para várias espécies de peixes, influenciando no desempenho dos reprodutores (Storebakken & Goswami, 1996) e da prole (Verakunpiriya et al., 1997) e aumentando a resistência a doenças (Tachibana et al., 1997). Dentre os carotenóides, a astaxantina e o β-caroteno se destacam por elevarem os fatores humorais (atividade complemento e lisozima) e celulares (fagocitose e citotoxicidade não-específica) (Amar et al., 2000, 2001).

Com relação aos níveis de exigência de vitamina A, estes são definidos como a concentração mínima que resulta na maior taxa de crescimento, maior concentração de vitamina testada no fígado e ausência de modificações sanguíneas ou histológicas (Hepher, 1988). Para peixes de água doce, os níveis de inclusão de vitamina A para um crescimento favorável foi calculada entre 600 (2000 UI) a 1200 μg/kg^{-1} (4000 UI) (Shim & Tan, 1990) (Tabela 3).

Tabela 3. Exigência de vitamina A para o crescimento de peixes cultivados.

Espécie	Exigência (UI kg^{-1})	Referência
Cyprinus carpio	4000 - 20000	NRC (1993)
Oncorhynchus mykiss	2500	NRC (1993)
Ictalurus punctatus	1000 - 2000	NRC (1993)
Oreochromis niloticus	5850 - 6970	Hu et al. (2006)
Oreochromis niloticus	4800	Bacconi (2003)
Oreochromis niloticus	1543 - 2403	Guimarães (2009)

Peil et al. (2007) estudaram a inclusão de diferentes níveis de vitamina A (3000, 9000 e 15000 UI/kg^{-1}) na dieta de pós-larva de jundiá *Rhamdia quelen* e os resultados comprovaram que a adição de 3000 UI de vitamina A na dieta aumenta a sobrevivência e o desempenho produtivo das pós-larvas. Bacconi (2003) estudou a exigência de vitamina A (0, 600, 1200, 1800, 2400, 3000, 3600, 4200 e 5400 UI de retinol/kg^{-1}) em alevinos de tilápia do Nilo alimentados durante 75 dias e concluiu que o nível de 4800 UI de retinol kg^{-1} foi suficiente para um bom desenvolvimento dos peixes. Nos animais que receberam dieta isenta de vitamina A o baço estava necrosado e granulomatoso e havia esplenomegalia. O fígado e todo o trato digestório apresentaram-se visualmente amorfos. Foram encontrados ainda os seguintes sinais característicos de deficiência de vitamina A: hemorragia na base da nadadeira lateral, catarata, exoftalmia, ascite, dilaceração renal e palidez do fígado. Os sinais clínicos característicos de deficiência diminuíram à medida que o nível de suplementação dietética do nutriente aumentou.

Sinais de deficiência de vitamina A em peixes estão relacionados com redução do crescimento, dos depósitos de gordura e do tamanho do fígado, danos ao epitélio, tecidos ósseo e conectivo (perda de massa muscular), redução na pigmentação e na sobrevivência dos peixes (Ornsrud et al., 2002). A deficiência dessa vitamina está associada também à redução da atividade de células NK e à habilidade de células esplênicas em produzir interferon. Adicionalmente, essa deficiência associa-se à redução da produção de anticorpos contra polissacarídeos bacterianos e antígenos protéicos (Pasatiempo et al., 1990).

Taveekijaram et al. (1994) observaram sinais clínicos semelhantes em *Oncorhynchus masou* alimentados com dieta deficiente em vitamina A após 105 dias de experimento. As lesões hepáticas foram as mais evidentes e os sinais de severidade aumentaram com o decorrer do tempo.

Goswami & Dutta (1991) observaram que *H. fossilis* alimentados com dietas isentas de suplementação com vitamina A apresentaram anemia, redução da taxa de hemoglobina, redução no número de eritrócitos, leucócitos e trombócitos, inibição da síntese de eritroblastos, redução do tamanho do citoplasma e do núcleo de corpúsculos celulares. Os peixes alimentados com dieta deficiente em vitamina A, por longo período de tempo, utilizam primeiramente a vitamina A armazenada no fígado e posteriormente nos olhos, ficando carentes de reserva desta vitamina e com maior susceptibilidade a enfermidades, principalmente bacterianas (Graham & Jones, 1969). Na truta arco-íris, essa deficiência promoveu uma redução na migração de leucócitos em comparação aos grupos suplementados com vitamina A (Thompson et al., 1995).

Guimarães (2009) avaliou o efeito de megadoses (2500, 5000, 10000, 20000 UI kg^{-1}) e ausência de vitamina A na dieta sobre o desempenho, parâmetros hematológicos, imunológicos e resistência de tilápias do Nilo à infecção experimental com *Streptococcus iniae*. A suplementação com vitamina A influenciou o crescimento dos animais e os melhores níveis para o ótimo fisiológico variaram de 1543 a 2403 UI kg^{-1} da dieta. A deficiência da vitamina provocou redução no desempenho da espécie, hemorragias na pele, lábios e base das nadadeiras, apresentando quadro hemorrágico severo após 10 semanas, com deformidade óssea e nos opérculos, todavia, demonstrou limitada influência sobre as respostas imunes (produção de ânion superóxido,

imunoglobulina sérica e atividade da lisozima) e na resistência dos animais à infecção por *S. iniae*. O autor sugeriu que a vitamina A possui grande poder antioxidante, evidenciado pela reduzida fragilidade eritrocitária. Sugeriu, ainda, que o excesso de vitamina A pode ocasionar problemas metabólicos a longo prazo.

No estudo supracitado, com tilápia do Nilo, após o estímulo pelo frio e desafio com *Aeromonas hydrophila*, os peixes que receberam dieta com 6400 UI kg^{-1} apresentaram as menores produções de H_2O_2 e NO e os peixes suplementados com 800 e 3200 UI kg^{-1} os maiores valores. A vitamina A também influenciou a atividade do "burst" respiratório de monócitos. Com base no perfil de proteínas plasmáticas pode-se estimar que o nível de 4138 UI kg^{-1} proporciona maior higidez às tilápias (Guimarães, 2009).

No processo reprodutivo dos peixes de água doce, o retinal é depositado nos oócitos dos peixes como fonte de ácido retinóico para o futuro embrião (Irie & Seki, 2002). Nesse sentido, Also et al. (2008) estudaram as exigências de ácido retinóico na reprodução de peixe zebra. Peixes alimentados com dieta deficiente em vitamina A demonstraram redução de retinóides no corpo (retinol e retinal), 68% em fêmeas e 33% nos machos. As fêmeas também produziram 73% menos ovos, e os produzidos continham 78% menos retinóides que os peixes alimentados com dietas suplementadas com vitamina A. As fêmeas foram mais afetadas durante o período reprodutivo pela falta de vitamina A do que os machos. Os autores concluíram que a vitamina A desempenha papel fundamental na reprodução desta espécie.

Na última década, muitos estudos têm relatado a influência das vitaminas na deformidade de larvas. Em particular, elevados níveis de vitamina A têm demonstrado afetar negativamente a morfogênese durante as primeiras semanas de vida, quando o ácido retinóico induz malformações no esqueleto de muitas espécies de larvas de peixes (Dedi et al., 1995; Suzuki et al., 1999). Em larvas de salmão do Atlântico, a suplementação de altos níveis de vitamina A (938 mg de retinol kg^{-1}) provocou redução do crescimento, do tamanho do fígado e do depósito de tecido adiposo, sendo observado também danos ao tecido ósseo e taxa de mortalidade elevada (Ornsrud et al., 2002). Villeneuve et al. (2005) alimentaram larvas de *Dicentrarchus labrax* com níveis crescentes de vitamina A (0, 10, 50, 250 e 1000 mg/kg^{-1}) e observaram que as alimentadas com 1000 mg kg^{-1} da vitamina tinham peso corporal 19 e 27% menor do que as alimentadas com 50 mg kg^{-1}. Esse mesmo nível também provocou falha no crescimento e anormalidades no esqueleto e afetou a maturação do intestino e do pâncreas. Os pesquisadores observaram uma correlação linear entre nos níveis de vitamina A e a porcentagem de malformações, concluindo que a suplementação com níveis elevados de vitamina A durante o estágio larval induziu malformações no esqueleto e o melhor nível de suplementação de vitamina A para esta espécie foi de 31 mg kg^{-1}.

Níveis elevados de vitamina A (0,08 g/kg^{-1}) e ácidos graxos poliinsaturados (175 g/kg^{-1} de lecitina de soja) foram avaliados durante várias fases do desenvolvimento larval de *Dicentrarchus labrax*. A morfogênese das larvas foi afetada pela dieta suplementada com estes dois nutrientes, principalmente nos estágios iniciais do desenvolvimento, resultando em dois tipos de malformação, ou seja, redução do número de

segmentos vertebrais e malformação da espinha na região cefálica (Villeneuve et al., 2006).

Mazurais et al. (2008) testaram a influência de uma alimentação suplementada com uma mistura de vitaminas recomendada pelo Council´s (U.S) no processo de ossificação de larvas de *Dicentrarchus labrax* durante 38 dias. As porcentagens testadas foram 0,5%, 1,5%, 2,5%, 4,0% e 8,0%. Todas as larvas alimentadas com o nível 0,5% morreram antes de 30 dias. Após 38 dias, as larvas alimentadas com o nível 1,5% tiveram uma porcentagem de sobrevivência de 33%, enquanto que os demais grupos, com porcentagem de vitamina maior, tiveram uma porcentagem de sobrevivência de 50%. As larvas alimentadas com a dieta suplementada com níveis maiores de vitamina demonstraram menor porcentagem de deformidades na coluna vertebral e maior formação de ossos mineralizados. Já nas larvas suplementadas com níveis reduzidos de vitaminas foi encontrado maior número de receptor peroxissoma ativado (PPARs), que é um importante receptor de proteínas, responsável pela diferenciação celular, desenvolvimento e metabolismo do organismo. O maior número desse receptor encontrado nas larvas possivelmente converteu osteoblastos em adipócitos durante as duas primeiras semanas de vida, e essa perda de osteoblastos possivelmente ocorreu devido às deformações ocorridas na coluna vertebral.

d) Vitamina D

A vitamina D (Figura 9) é uma vitamina lipossolúvel, e ao contrário das vitaminas C, E e A, que são obtidas somente por meio da alimentação, a vitamina D pode ser produzida pelo organismo por uma reação fotossintética após exposição a luz solar. Além disso, devido à sua estrutura química ser semelhante à dos hormônios esteróides, ela é considerada um hormônio (Holick, 1999).

A vitamina D pode ser encontrada em duas formas, como ergocalciferol (vitamina D_2, $C_{28}H_{44}O$), produzido pelas plantas e convertido em ergosterol, ou como colicalciferol (vitamina D_3, $C_{27}H_{44}O$) produzido pelos tecidos animais pela ação da luz ultravioleta (290-310nm) e convertido em 7-dehidrocolesterol na pele dos animais, sendo convertido posteriormente em pré-vitamina D_3. Uma vez formada, a pré-vitamina D_3, sob indução térmica, produz homodímeros em aproximadamente 24 horas, transformando-se em vitamina D_3 (Figura 10) (Miller & Portalle, 1999; revisto por Chagas et al., 2003).
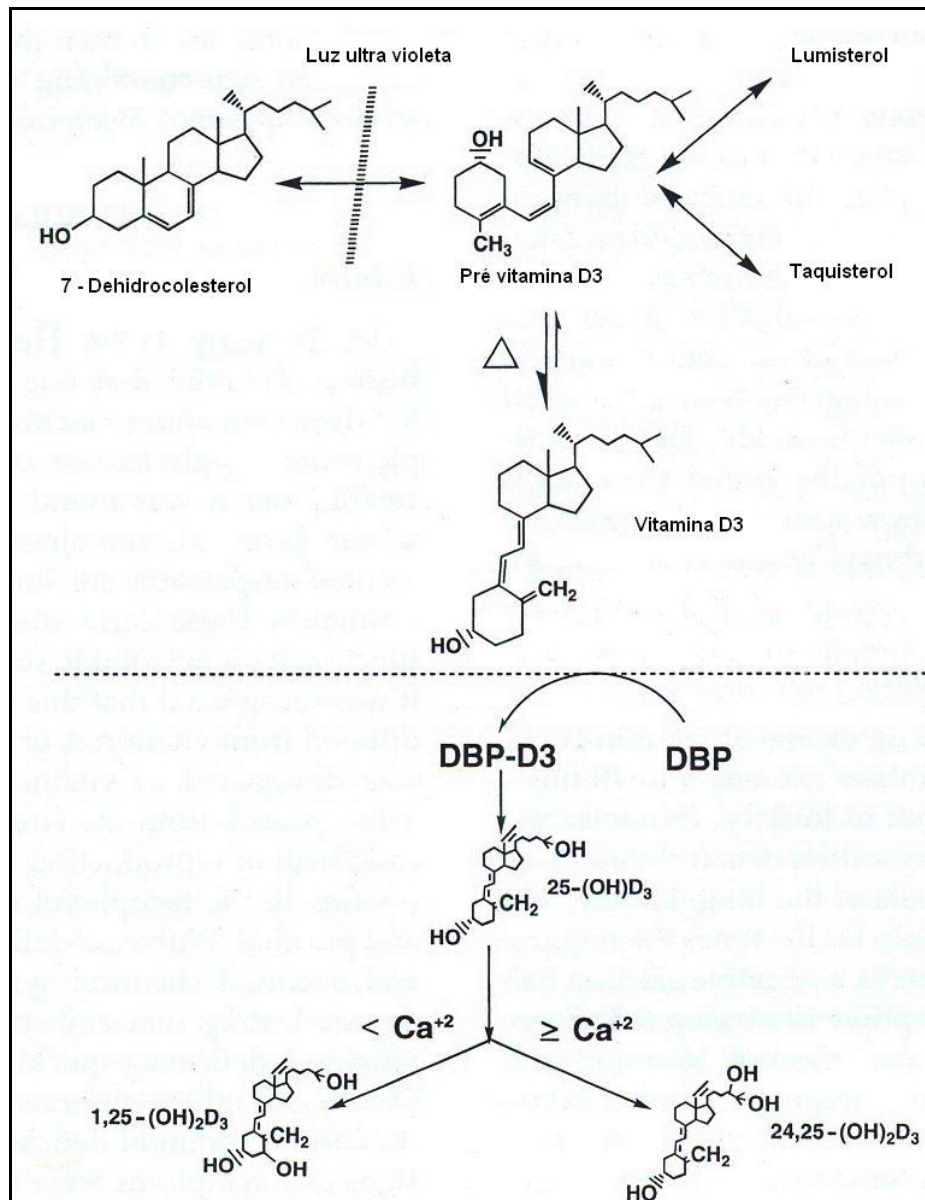
Figura 9. Estrutura da vitamina D.
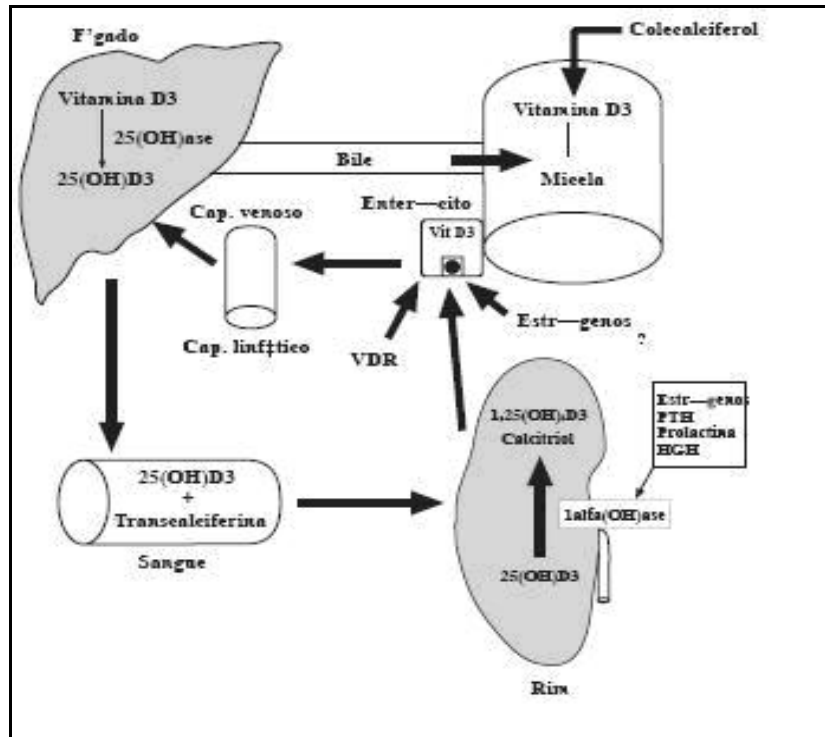
Figura 10. Esquema do metabolismo da vitamina D a partir de sua ingestão sob a forma de colicalciferol até seu retorno ao enterócito na forma de calcitriol. Grudtner et al. (1997).

Os peixes não são capazes de sintetizar a vitamina D, provavelmente pela impossibilidade da luz solar alcançar os níveis mais profundos da coluna d´água (Lovell, 1989). Como esses animais não dispõem de uma via endógena de formação desta vitamina (pele), tem em seu aporte exógeno um importante fator para a manutenção de níveis ideais às necessidades orgânicas. As principais fontes de vitamina D limitam-se a ingestão de plâncton e de alimentos artificiais (Holick, 2004).

Quando ingerida, a vitamina D_3 é absorvida no intestino delgado, incorporada ao quilomícrons e carreada por estes até o fígado. A partir deste momento, o metabolismo é idêntico ao da vitamina D_3 sintetizada pela pele (Holick, 1999). No fígado, a vitamina D_3 é convertida em 25-hidroxivitamina D (25OHD3), denominada calcidiol pela hidroxilação do carbono 25, mediada pela enzima D3-25-hidroxilase (25-OHase), no retículo endoplasmático das células hepáticas. Cerca de 75% da vitamina D circulante são convertidos a 25OHD3 em sua primeira passagem pelo fígado (Prosser & Jones, 2004). Nos peixes teleósteos, como em outros vertebrados, o fígado é o principal órgão de estoque de vitamina D (Cerezuela et al., 2009). A vitamina D gera metabólitos, os quais são denominados de 1,25(OH)2D, 24R,25

dihidroxivitamina D, 24,25 hidroxivitamina D e 24S,25-dihidroxivitamina D, formados no rim pela enzima 25-OHD-24-hidroxilase (Henry, 2001).

Os efeitos biológicos da 1,25(OH)2D são mediados pelo fator de transcrição nuclear conhecido como receptor de vitamina D. Após penetrar no núcleo celular, a 1,25(OH)2D se associa ao receptor de vitamina D. O complexo formado se liga ao receptor de ácido retinóico formando heterodímeros, que atuam nos elementos resposta da vitamina D, iniciando uma cascata de interações moleculares que irão modular a transcrição de genes específicos (Kimball et al., 2008).

Certos peixes, não somente os teleósteos, que possuem um esqueleto calcificado, possuem elevadas concentrações de vitamina D, em comparação com outros vertebrados maiores, especulando-se que a função desta vitamina e de seus receptores pode ser diferente das funções clássicas comumente relacionadas para animais terrestres (Rao & Raghuramulu, 1999).

As funções básicas do 1,25(OH)2D estão relacionadas a homeostase do cálcio e fósforo, ao metabolismo ósseo (manutenção da integridade da coluna vertebral) e a regulação de mais de 60 genes situados em diferentes tecidos do organismo (Norman, 2008). Essa vitamina também está envolvida no crescimento e na diferenciação celular, na modulação do sistema imune (receptores de vitamina D são expressos na maioria das células do sistema imune, incluindo células T e antígenos, assim como células dendríticas e macrófagos) e na participação de dois aspectos importantes da função neuromuscular (força e equilíbrio). A deficiência de vitamina D pode levar a redução da secreção de insulina, podendo induzir à intolerância a glicose (Griffin et al., 2003; Lin & White, 2004; Mathieu et al., 2005).

Quanto ao desenvolvimento dos peixes, sabe-se que a vitamina D contribui para o aumento do crescimento e do ganho de peso. A exigência desta vitamina é espécie específica (Tabela 4), e sofre alterações, de acordo com a idade, taxa de crescimento, interação com nutrientes e exposição a agentes estressores, principalmente oscilação térmica, poluentes e outros. A adição de lipídios na dieta facilita a absorção da vitamina D (revisto por Chagas et al., 2003).

Tabela 4. Exigência de vitamina D para o crescimento de peixes cultivados.

Espécie	Exigência (UI kg^{-1})	Referência
Ictalurus punctatus	500	Lovell & Li (1978)
Ictalurus punctatus	1000	Andrews et al. (1980)
Ictalurus punctatus	250	Brown (1988)
Ictalurus punctatus	2000	Brown & Robinson (1992)
Oreochromis niloticus x *O. aureus*	374,8	Shiau & Hwang (1993)
Oncorhynchus mykiss	1600	Barnett et al. (1982)
Colossoma macropomum	1000	Mendes (2000)

A vitamina D é a mais tóxica de todas as vitaminas, desde que estocada e metabolizada lentamente pelo organismo. Os sinais característicos de hipervitaminose D incluem perda do apetite, hipercalcemia, danos irreversíveis ao rim e ao sistema cardiovascular (Champe & Harvey, 1997; Eitenmiler & Landen Junior, 1999). Deficiências causadas pela ausência de vitamina D na dieta dos peixes provocam redução do ganho de peso, sobrevivência, dos níveis de cálcio e fósforo nos ossos e plasma, potássio no soro, incidência de tetania e lordose, e perda de dentes. Esses sinais de deficiência foram observados em várias espécies de peixes como: *Ictalurus punctatus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, *O. niloticus* e *Colossoma macropomum* (Lovell & Li, 1978; Andrews et al., 1980; Barnett et al., 1982; Brown & Robinson, 1992; Shiau & Huang, 1993; O'Connell & Gatlin III, 1994; Mendes, 2000; revisto por Chagas et al., 2003).

Com relação à atuação da vitamina D_3 no sistema imune dos peixes, Cerezuela et al. (2009) administraram diferentes níveis (0, 3750, 18750, e 37500 UI kg^{-1}) dessa vitamina na dieta de *Sparus aurata*, principal espécie cultivada no Mediterrâneo. Os peixes que receberam a suplementação de 3750 UI vitamina D kg^{-1} da dieta durante uma semana apresentaram aumento da atividade citotóxica natural dos leucócitos. Após duas semanas de alimentação, os peixes suplementados com os níveis 3750 e 18750 UI/kg^{-1} demonstraram aumento significativo da capacidade fagocítica dos leucócitos, e os peixes suplementados com o nível mais alto da vitamina (37500 UI/kg^{-1}) demonstraram além de aumento da capacidade fagocítica também aumento da peroxidase no soro. Os autores sugerem que a vitamina D_3 influencia beneficamente os parâmetros do sistema imune inato de *Sparus aurata*, sugerindo que receptores similares àqueles presentes em mamíferos estão envolvidos na ação desta vitamina no sistema imune dos peixes.

B – Lipídios

Os lipídios são compostos orgânicos insolúveis em água e solúveis em solventes não polares (éter, clorofórmio e benzeno). Neste grupo, estão incluídos: gorduras, óleos, gomas, fosfolipídios, colesterol, vitaminas lipossolúveis e alguns hormônios. Os lipídios podem ser classificados como simples ou complexos. Os lipídios simples são denominados ésteres de ácidos graxos com vários álcoois, dentre estes, as gorduras e ceras. Já os complexos se caracterizam pelos ésteres de ácidos com outros grupos além do álcool e um ácido graxo, tais como os fosfolipídios e glicolipídios (Pezzato et al., 2004).

Os lipídios dietéticos são fontes importantes de energia e ácidos graxos, necessários para o desenvolvimento normal dos animais, sendo que, principalmente na forma de triacilglicerol, são hidrolisados pelas enzimas digestivas numa mistura de ácidos graxos livres e 2-monoglicerídeos para, então, serem absorvidos e utilizados na síntese de vários componentes celulares ou catabolizados para produção de energia. Os lipídios dietéticos contêm ácidos graxos saturados e insaturados, dentre os quais, estão os ácidos graxos poliinsaturados que se caracterizam por serem ácidos graxos com 18 ou mais átomos de carbono e duas ou mais duplas ligações (NRC, 1993).

Como em outros vertebrados, os peixes não conseguem sintetizar os ácidos graxos linoléico (18:2 n-6) e ácido linolênico (18:3 n-3), devendo ser supridos na dieta de acordo com as exigências de ácidos graxos essenciais. Os peixes possuem habilidade de converter os ácidos graxos insaturados de 18 átomos de carbono em ácidos graxos altamente insaturados da mesma série (Owen et al., 1975). A exigência dos ácidos graxos essenciais nos peixes está relacionada de certa forma, à sua habilidade de modificar metabolicamente estes compostos. Os peixes de água doce parecem ter maior capacidade de elongar e dessaturar os ácidos graxos sintetizados por algas e plantas em eicosapentanóico (EPA) e docosahexanóico (DHA) (Moreira et al., 2001; Souza et al., 2007), por possuírem as enzimas Δ6- e Δ5-dessaturase (Sargent et al., 1995).

Dentre as principais funções dos lipídios da dieta nos peixes pode-se destacar o atendimento da demanda energética na forma de ATP, a função carreadora de vitaminas lipossolúveis, o favorecimento do sabor e da textura da ração, além de ser fonte de ácidos graxos essenciais (Logato, 2000). Além de atender as exigências nutricionais dos peixes, ambas as séries de ácidos graxos essenciais (n-3 e n-6) produzem quatro séries de eicosanóides fisiologicamente ativos como prostaglandinas, prostaciclinas, tromboxanos e leucotrienos, envolvidos na contração muscular de alguns órgãos, coagulação sanguínea e processos imunológicos e inflamatórios (Logato, 2000; Haliloglu et al., 2003).

Outra função importante dos ácidos graxos poliinsaturados é a sua participação na formação dos fosfolipídeos da membrana celular e organelas, que são responsáveis pela manutenção da integridade, fluidez e permeabilidade da célula (Logato, 2000). A fluidez da membrana depende do balanço adequado de ácidos graxos essenciais saturados e insaturados que compõem os fosfolipídeos presentes. Os ácidos graxos da família n-3 possuem um papel importante na manutenção da fluidez da membrana fosfolipídica principalmente em baixas temperaturas. Estudos mostram que os peixes possuem capacidade de alterar a composição dos fosfolipídeos das membranas frente às mudanças de temperatura do ambiente (Fracalossi & Lovell, 1995; Webster et al., 1994).

Exigências dos peixes quanto aos ácidos graxos essenciais

Os ácidos graxos essenciais são sintetizados de forma limitada pelos peixes e devem ser fornecidos na dieta para atender suas exigências nutricionais e promover a manutenção do bom estado de saúde (New, 1987). De uma maneira geral, observa-se que as exigências nutricionais de ácidos graxos essenciais variam, entre outros fatores, com a espécie, tamanho dos peixes, temperatura da água e fontes de alimento natural presentes no ambiente (NRC, 1993).

As exigências de ácidos graxos para algumas espécies de peixes são apresentadas na Tabela 5. Nos peixes, a composição, distribuição e relação entre as séries n-3 e n-6 são influenciadas basicamente por três fatores: genéticos (espécie, etapa de desenvolvimento, entre outros), ambientais (temperatura e salinidade) e, fundamentalmente nutricionais (Justi et al., 2003). Geralmente, os peixes de água doce exigem o ácido linoléico (18:2 n-6) e/ou ácido linolênico (18:3 n-3) (Pezzato et al., 2004), enquanto que os

peixes marinhos exigem o ácido eicosapentanóico (20:5 n-3) e/ou o docosahexanóico (22:6). Em adição, as espécies de águas quentes têm uma exigência específica menor para os ácidos graxos da série n-3 que as de água fria (Sargent et al., 2002).

Tabela 5. Exigência de ácidos graxos, em percentual (%), para algumas espécies de peixes cultivadas.

Espécie	Ácido graxo	Exigência (%)	Referências
Peixes de água doce			
Cyprinus carpio	18:2*n*-6 e 18:3*n*-3	1,0	Watanabe et al. (1975); Takeuchi & Watanabe (1977a)
Ctenopharyngodon idella	18:2*n*-6 e 18:3*n*-3	1,0 e 0,5	Takeuchi et al. (1991)
Ictalurus punctatus	18:3, n-3 20:5(n-3) e 22:6(n-3)	1,0 – 2,0 0,5-0,75	Satoh et al. (1989a)
Oncorhynchus mykiss	18:3, n-3	0,7-1,0	Castell et al. (1972); Watanabe et al. (1974); Takeuchi & Watanabe (1977b)
Oncorhychus kisutch	18:2*n*-6 e 18:3*n*-3	1,0 e 1,0	Yu & Sinnhuber (1979)
Oreochromis niloticus	18:2, n-6	0,5	Kanazawa et al. (1980); Takeuchi et al. (1983)
Tilápia híbrida	18:2 e 18:3	0,5	Chou & Shiau (1999)
Tilapia zilli	18:2, n-6 e 20:4(n-6)	1,0	Kanazawa et al. (1980)
Peixes marinhos			
Dicentrarchus labrax	*n*-3 HUFA	1,0	Coutteau et al. (1996)
Lates calcarifer	20:5(n-3) e 22:6(n-3)	1,0	Buranapanidgit et al. (1989)
Pagrus major	20:5 (*n*-3) e 22:6(*n*-3)	1,0 e 0.5	Takeuchi et al. (1990)
Scophthalmus maximus	20:4(n-6) 20:5(n-3) e 22:6(n-3)	~0.3 0,8	Castell et al. (1994) Gatesoupe et al. (1977)
Sebastes schlegeli	20:5 (*n*-3) e 22:6(*n*-3)	1,0	Lee et al. (1994)
Sparus aurata	22:6(*n*-3): 20:5 (*n*-3)	0.5	Ibeas et al. (1997)
Pleuronectes ferrugineus	n-3 HUFA	2.5	Whalen et al. (1999)

Abreviaturas: Ácido linoléico, 18:2(n-6); ácido linolênico, 18:3(n-3); EPA (ácido eicosapentaenóico), 20:5(n-3); ácido araquidônico, 20:4(n-6); DHA (ácido docosahexaenóico), 22:6(n-3) e HUFA (ácido graxo altamente insaturado).

Para alevinos de tilápia do Nilo, Meurer et al. (2002) recomendam o nível de 3,0 % de lipídios na dieta e ressaltam que os lipídios são menos aproveitados que os carboidratos como fonte de energia. No caso de surubins (*Pseudoplatystoma coruscans*), a inclusão de 6%, 10%, 14% e 18% de lipídios na dieta, durante 62 dias, promoveu maior ganho de peso, sendo este proporcional ao aumento dos níveis de lipídios. O óleo de soja foi considerado uma excelente de fonte de energia para os surubins (Martino et al., 2002).

A deficiência dos ácidos graxos essenciais, ou de seus precursores, causa diminuição no crescimento, piora na conversão alimentar, aumento de líquido nos músculos, despigmentação, ulcerações nas nadadeiras, degeneração gordurosa no fígado, aumento da taxa respiratória, prejuízo na eritropoiese e aumento da taxa de mortalidade. Outros sinais clínicos de deficiência relatados são a síndrome do choque e as miocardites (Takeuchi et al., 1980; Satoh et al., 1989b), além de redução do desempenho reprodutivo em carpa comum (Shimma et al., 1977) e truta arco-íris (Leray et al., 1985).

O excesso de lipídios utilizado em dietas para peixes também é prejudicial, podendo causar desequilíbrio da relação energia e proteína e depósito excessivo de gordura na cavidade celomática (Figura 11) e nos tecidos, o que afeta adversamente o rendimento, qualidade do produto e seu armazenamento (Logato, 2000). De forma semelhante, Wang et al. (2005) relataram que a inclusão de níveis de lipídios dietéticos acima de 15% aumentou a deposição de lipídios na musculatura do bijupirá (*Rachycentron canadum*), quando foi utilizado o óleo de peixe e de milho como fonte de lipídios, durante 6 semanas.

Outro problema comumente encontrado em dietas para peixes contendo altos níveis de lipídios é a oxidação lipídica. Os ingredientes utilizados na formulação destas dietas muitas vezes possuem grande quantidade de ácidos graxos insaturados, que são facilmente oxidados, formando complexos tóxicos que podem impedir o completo metabolismo dos lipídios e formação de ceróides, que são depositados nas células hepáticas (fígado gordo), prejudicando as suas funções e causando necrose no tecido hematopoiético dos rins. Desta forma, o uso de lipídios em dietas para peixes geralmente requer a utilização adequada de antioxidantes (NRC, 1993; Puangkaew et al., 2005).

Os antioxidantes previnem ou retardam a oxidação lipídica sendo recomendadas principalmente para dietas contendo altos níveis de ácidos graxos em sua composição. Estes compostos protegem principalmente os ácidos graxos insaturados, vitaminas lipossolúveis e caroteno. A rancificação oxidativa ou peroxidação lipídica afeta os valores nutricionais dos lipídios, oxidação de vitaminas e outros componentes nutricionais. Dentre os antioxidantes utilizados há os naturais (L-tocoferol ou lecitina) e os sintéticos (BHA, BHT, etoxiquina), sendo estes os mais comumente empregados (Logato, 2000).
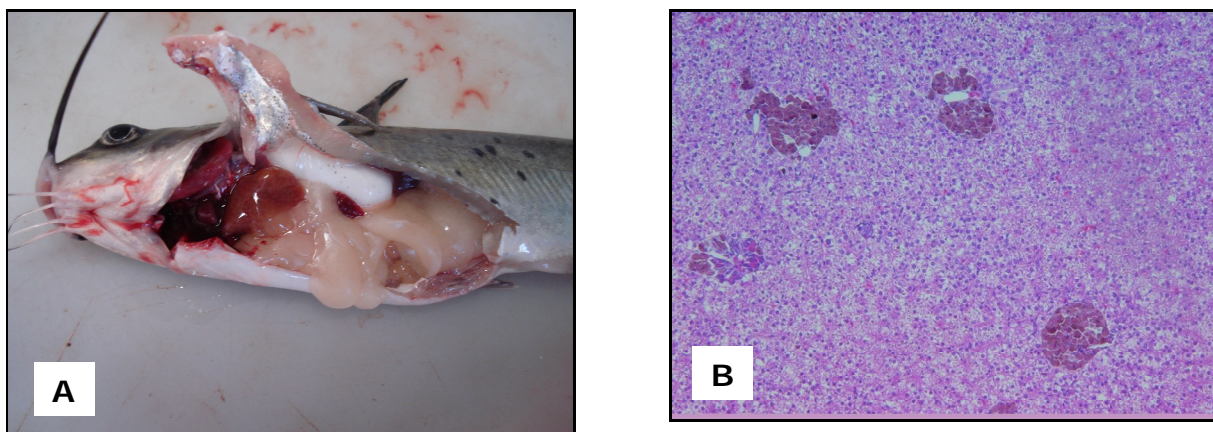
Figura 11. Exemplar de *I. punctatus* apresentando acúmulo de gordura na cavidade celomática (**A**), com detalhe para a necrose esteatose discreta em fotomicrografia do fígado (**B**). Aumento de 400x HE (Fonte: Pilarski, 2008).

Efeitos fisiológicos dos ácidos graxos

A principal razão para a suplementação de lipídios na dieta de peixes cultivados é poupar a utilização da proteína dietética como fonte de energia, principalmente para os peixes carnívoros (Pezzato et al., 2004). Os lipídios não somente atendem as funções energéticas de crescimento e manutenção dos peixes, como também auxiliam nas funções do rim e das brânquias, desenvolvimento neural e visual, reprodução e sanidade (Henderson & Tocher, 1987; Sargent et al., 1989; Tocher, 2003). Além disso, os lipídios dietéticos estão envolvidos no transporte de nutrientes lipossolúveis, tais como esteróis e vitaminas, e síntese de hormônios, prostaglandinas e outros componentes metabolicamente ativos (Lim et al., 2005).

Os lipídios e o perfil dos ácidos graxos presentes na dieta podem influenciar a composição dos ácidos graxos na carcaça (Takeuchi, 1997; Jobling et al., 1998; Visentainer et al., 2005; Hansen et al., 2008), na resposta imune não específica e, por conseqüência, na resistência às doenças da maioria dos animais, inclusive em peixes (Blazer, 1992; Balfry & Higgs, 2001; Gatlin III, 2002). O mecanismo pelos quais os ácidos graxos presentes na dieta de peixes atuam na resposta de defesa tem sido atribuído, em parte, pela influência na produção da prostaglandina e leucotrienos pelos macrófagos. Os ácidos graxos também agem sobre a proteína quinase C modificando os sinais de transdução e atuando sobre os receptores de membrana, regulação do gene e função do macrófago. Outro mecanismo pelos quais os lipídios da dieta atuam sobre a resistência às doenças é a produção de eicosanóides imunologicamente ativos formados a partir do ácido araquidônico monoesterificado (AA), ácido eicosapentanóico, ácido docosahexanóico e possivelmente outro precursor de ácido graxo poliinsaturado, 20:3n-6 (Chang et al., 1992; Lim et al., 2005). A produção

dos eicosanóides está associada a situações estressantes e aos processos fisiológicos normais, sendo considerados moduladores da resposta imune. O excesso de produção dos mesmos ocorre frequentemente em condições patológicas (Sargent et al., 2002). Os eicosanóides são produzidos a partir dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) de 20 carbonos, graças à ação da cicloxigenase e a lipoxigenase resultando em metabólitos que incluem as prostaglandinas, leucotrienos e lipoxis, que influenciam as funções imunes (Uhing et al., 1990; Stankova & Rola-Pleszczynski, 1993). As prostaglandinas (PGE2) derivadas do ácido araquidônico são produzidas pelos monócitos e macrófagos e estão associadas à modulação da resposta imune celular (Kinsella & Lokesh, 1990) ao passo que a PGF2α está mais relacionado à adaptação ao estresse ambiental (Mustafa & Srivastava, 1989).

A própria composição lípidica da membrana e suas propriedades podem ter efeito sobre a modulação da resposta celular e resistência às doenças já que algumas respostas de defesa são baseadas na interação das membranas dos leucócitos, para ativação da produção de citocinas (Balfry & Higg, 2001; Montero et al., 2003). Segundo Mills et al. (2005), os ácidos graxos poliinsaturados n-3 (PUFAs) são reconhecidos por sua ação antinflamatória, a qual é iniciada e propagada por diversos mecanismos envolvendo as células do sistema imune. Esses mecanismos estariam relacionados com perfil de eicosanóides, fluidez da membrana, sinal de transdução, expressão do gene e a apresentação do antígeno.

Os ácidos graxos dietéticos têm efeitos benéficos diretos e indiretos sobre a reposta imune, na produção das citocinas (Endreas et al., 1989; Yaqoob & Calder, 1995; Pablo et al., 2002) ou na proliferação dos linfócitos (Endreas et al., 1989; Meydani et al., 1991; Secombes, 1985; Yaqoob et al., 1994; Pablo et al., 2002). Em bagre do canal *Ictalurus punctatus*, um aumento da atividade bactericida dos macrófagos foi observado no grupo alimentado com óleo de savelha em comparação aos peixes alimentados com óleo de soja, milho ou sebo bovino (Sheldon Junior & Blazer, 1991). O aumento da atividade dos macrófagos renais pode estar associado ao aumento de ácidos graxos n-3 em bagre do canal (Blazer, 1992) e truta arco-íris (Ashton et al., 1994). Além disso, salmão do Atlântico *Salmo salar* alimentado com dietas contendo altos níveis de n-3/n-6 PUFA apresentou aumento na resposta do linfócito B e na taxa de sobrevivência quando desafiado com *Aeromonas salmonicida* e *Vibrio anguillarum* (Thompson et al., 1996).

Com relação às fontes de óleos da dieta, Ferreira (2008) observou que a inclusão de óleo de soja melhorou as funções imunes (maior atividade bactericida e da lisozima, além da maior concentração de ferro e conseqüentemente menor capacidade de ligação de ferro) e a resistência de tilápias do Nilo contra infecção por *Steptococcus agalactiae*, enquanto as dietas contendo óleo de linhaça, óleo de peixe (ricos em ácidos graxos n-3) e óleo de oliva (rico em ácidos graxos n-9) foram associadas à imunossupressão. Ainda sobre a inclusão de óleos vegetais, Montero et al. (2008) observou que essa suplementação em *Sparus aurata* afetou os parâmetros imunes humoral e celular, reduzindo a atividade do sistema complemento via alternativa no soro e a atividade fagocítica de leucócitos no rim anterior.

Em salmão do Atlântico, Brandsen et al. (2003) verificaram aumento na mortalidade acumulada em peixes alimentados com óleo de girassol e desafiados com *V. anguillarum*. De forma semelhante, Li et al. (1994) observaram que bagres de canal suplementados com 2,0% de óleo de savelha apresentaram maior taxa de mortalidade que aqueles alimentados com óleo de vísceras de bagre do canal ou sebo bovino. Contudo não houve diferença significativa na produção de anticorpos após o desafio com a bactéria *E. ictaluri*. Ainda, com relação ao óleo de savelha, em bagre do canal foi observada uma elevada produção de anticorpos duas semanas após a imunização com *Edwardsiella ictaluri* em relação a outras dietas que continham óleo de milho, óleo de linhaça ou a mistura de óleo de savelha, milho e gordura bovina (1:1:1) (Fracalossi & Lovell, 1994).

Diminuição significativa no número de leucócitos circulantes e na atividade respiratória dos macrófagos após alimentação com dietas contendo óleo vegetal (linhaça, oliva e girassol) foi observada em *Dicentrarchus labrax* em comparação aos que receberam dieta contendo óleo de peixe. Estes autores não observaram diferença entre a porcentagem de hematócrito, número de eritrócitos circulantes e atividade da lisozima sérica nos diferentes tratamentos (Mourente et al., 2005). Resultados semelhantes foram observados por Bell et al. (1996) em salmão do Atlântico alimentado com dieta contendo óleo de linhaça ou girassol, com relação à atividade de lisozima e do complemento ou porcentagem de hematócrito. Em adição, Montero et al. (2003) observaram redução na atividade do sistema complemento sérico e atividade fagocítica, embora não houvesse alteração na atividade da lisozima ou do neutrófilo em *Sparus aurata* alimentados com dieta contendo óleo de soja (rica em ácido graxo 18:2n-6).

O efeito da inclusão de alguns lipídios (óleo de milho, óleo de savelha, óleo de linhaça e sebo bovino) na dieta para tilápia do Nilo foi avaliado por Yildirim-Askoy et al. (2007). Esses autores observaram que a atividade da lisozima e do sistema complemento foi reduzida significativamente nos peixes alimentados com sebo bovino (fonte de ácido graxo saturado). Esta fonte lipídica foi, ainda, responsável pelo aumento da resistência dos peixes após desafio com *Streptococcus iniae*.

Com relação à suplementação do n-3 HUFA, observou-se uma redução na produção de anticorpos após a vacinação e na taxa de sobrevivência após o desafio com *Vibrio salmonicida* em salmão do Atlântico (Erdal et al., 1991). Ainda, o emprego de doses excessivas de n-3 HUFA foi responsável por aumentar a taxa de mortalidade em truta arco-íris (Kiron et al., 1995).

Para a tilápia do Nilo, a inclusão dos ácidos graxos essenciais n-3 e n-6 em sua dieta não influenciou o desempenho produtivo e parâmetros hematológicos, mas houve um incremento na resposta inflamatória crônica, com acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos tipo corpo estranho e Langhans nas lamínulas implantadas no tecido subcutâneo da espécie (Sakabe, 2007).

Alguns estudos mostram um efeito negativo da dieta contendo HUFA n-3 sobre a resposta imune causado pela diminuição da produção de leucotrieno B_4 e o aumento dos leucotrienos B_5 pelos macrófagos e neutrófilos (Leitch et al., 1984; Lee et al., 1985). O leucotrieno B_4 é um eicosanóide que tem efeito imunoestimulatório que inclue a proliferação de linfócitos e ação quimiotáxica e quimiocinética do leucócito, enquanto que o

leucotrieno B_5 é outro eicosanóide com ação imunossupressora (Goldman et al., 1983). O leucotrieno B_4 é produzido principalmente a partir do ácido graxo 20:4n-6, enquanto que o leucotrieno B_5 é derivado principalmente a partir do ácido graxo 20:5n-3. A redução da resposta imune dos peixes alimentados com dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados n-3 pode ser causada, em parte, pela competição inibitória do metabolismo do AA pelos ácidos graxos n-3. Há uma competição inibitória entre os ácidos graxos da família n-6, n-3 e n-9 por desnaturases responsáveis pela síntese dos ácidos graxos poliinsaturados (Goldman et al., 1983; Kragballe et al., 1987; Hwang, 1989; Secombes et al., 1994).

Utilização dos lipídios

O ácido linoléico conjugado (ALC) tem sido amplamente estudado nos últimos anos, em virtude de seus benefícios à saúde humana (Whigham et al., 2000). O ALC consiste num grupo de ácidos octadecadienóicos, que são isômeros conjugados posicionais e geométricos do ácido linoléico (C18:2), cujas duplas ligações são separadas por uma ligação simples carbono-carbono no lugar de um grupo metileno, dois dos quais (cis-9, trans-11 e trans-10, cis-12 ALC) possuem atividades biológicas (Pariza et al., 2001). O 18:2 (cis-9, trans-11) é considerado a forma primária de ALC presente naturalmente nos alimentos, ainda que o 18:2 (cis-9, trans-11) e o 18:2 (trans-10, cis-12) sejam os dois isômeros predominantes e presentes em níveis semelhantes no ALC sintético (Chin et al., 1992). Recentemente, aumentaram as evidências de que os isômeros cis-9, trans-11 e trans-10, cis-12 ALC podem agir beneficamente em sistemas biológicos de forma diferente (Santos et al., 2007).

Yasmin & Takeuchi (2002) determinaram o efeito do ácido linoleíco (AL) e ALC sobre o crescimento e composição corporal de juvenis de tilápia usando quatro tipos de dietas (AL/ALC: 8/0, 6/2, 4/6, 0/8). Nesse estudo, foi observada uma redução no conteúdo de lipídios do músculo e fígado, principalmente de triglicérideos, e no crescimento dos peixes quando da substituição de parte do AL por ALC.

Santos et al. (2007) avaliaram a influência da adição de ALC (2,0%) na dieta de tilápia do Nilo e observaram melhora nos parâmetros de desempenho produtivo, aumento na composição de ácidos graxos saturados e da proteína, e redução dos ácidos graxos n-6 nos filés. Observaram, ainda, aumento na composição de ácidos graxos n-3 e de ácidos graxos poliinsaturados totais no fígado.

Fosfolipídios é o termo geral que inclui todos os lipídios que contêm fósforo. São constituintes de membrana, desempenhando função estrutural de alta importância biológica no organismo dos peixes. Estes compostos são importantes precursores de mediadores biologicamente ativos no metabolismo e na fisiologia dos animais dentre os quais incluem os eicosanóides, diacilglicerol (DAG), inositol fosfatos e fatores de ativação de plaquetas (PAFs) (Tocher et al., 2008). Os fosfolipídios são requeridos para o crescimento, sobrevivência, prevenção de deformidades esqueléticas e possivelmente atuam sobre a resistência ao estresse de larvas e juvenis de peixes marinhos e de água doce (Koven et al., 1998; Cahu et al., 2003; Gisbert et al., 2005).

Geralmente, níveis de 2%-4% de fosfolipídios são requeridos em dietas para juvenis enquanto para as larvas a exigência é maior. Tronco et al. (2007) observaram que a fosfatidilcolina é uma boa fonte lipídica para larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). Entretanto muitas questões relacionadas aos fosfolipídios para peixes ainda não estão bem esclarecidas.

C - Minerais

Os minerais estão envolvidos no funcionamento dos processos vitais de todos os animais incluindo os peixes, e podem ser classificados em macrominerais, que são requeridos em quantidades maiores (poucos décimos de grama a alguns gramas por dia), e microminerais, também chamados minerais traço requeridos em pequenas quantidades (microgramas a miligramas por dia) (Ortolani, 2002; Webster, 2007). Estes últimos apresentam três níveis de atividade biológica: concentração traço requerida para o desenvolvimento e crescimento normal; concentração moderada que pode ser estocada e a função homeostática mantida e concentração elevada que pode resultar em efeitos tóxicos (Hamilton, 2004).

Dentre os elementos inorgânicos de importância, tem sido relatado para peixes alguns minerais tais como cálcio, fósforo, magnésio, ferro, cobre, manganês, zinco, selênio e iodo. Os peixes podem obter estes elementos inorgânicos a partir da dieta e/ou da água diferentemente dos animais terrestres. Geralmente, o cálcio, magnésio, sódio, potássio, ferro, zinco, cobre e selênio são obtidos pela água para satisfazer parte das necessidades nutricionais dos peixes, enquanto o fósforo e sulfatos são obtidos mais eficientemente pela dieta. Essa capacidade dos peixes de absorver os minerais da água pelas brânquias e pele é um dos grandes entraves no estudo da exigência dos mesmos (NRC, 1993).

Além da quantidade do elemento inorgânico no ambiente, a exigência varia conforme a fonte alimentar, espécie, estágio de desenvolvimento, estado fisiológico do animal, além da interação entre minerais e com vitaminas (Lall, 2002; Pezzato et al., 2004). A inter-relação pode-se manifestar como competição por sítios de ligação, transporte ou armazenamento das moléculas ou substituição no sítio ativo de uma enzima, ou como requerimento por um elemento para o próprio metabolismo do outro. Relações antagônicas ocorrem quando competem por mesmo sítio de ligação, como no caso de zinco/ cádmio, e magnésio/ manganês (Lall, 2002). Pode haver também interação entre elementos, como o selênio que possui elevada afinidade com elementos tóxicos como o mercúrio e a prata, reduzindo assim sua toxicidade (Pezzato et al., 2004).

Dentre as principais funções dos minerais destacam-se a formação de estrutura esquelética, transferência de elétrons, regulação do equilíbrio ácido-base e osmorregulação. Atuam também como componentes importantes de compostos orgânicos tais como, proteínas, lipídios, hormônios e enzimas, e agem como cofator em diversas reações enzimáticas (NRC, 1993; Watanabe et al., 1997; Webster, 2007). Além disso, muitos minerais possuem funções biológicas sobre o mecanismo de defesa orgânica e imunocompetência dos peixes (Webster, 2007).

O mecanismo de controle bioquímico e regulação de absorção, estocagem e excreção de vários elementos inorgânicos, permite ao peixe

viver em equilíbrio dinâmico com seu ambiente. Além disso, os eletrólitos Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Cl^-, e HCO^{3-} possuem importante papel na regulação osmótica e iônica dos fluidos extra e intracelular no peixe (NRC, 1993).
a) Macrominerais

Cálcio (Ca)

O cálcio atua no desenvolvimento e manutenção do sistema esquelético e participa de vários processos fisiológicos como batimento cardíaco, contração muscular, transmissão de impulsos nervosos, coagulação sanguínea, manutenção da integridade celular, equilíbrio ácido-base e ativação de várias enzimas importantes (NRC, 1993; Pezzato et al., 2004).
A exigência de cálcio nos peixes é satisfeita em grande parte pela absorção pelas brânquias e pele (Ribeiro et al., 2006). Geralmente, a quantidade de cálcio dos ingredientes da dieta supre as suas exigências, sem necessidade de suplementação. O íon cálcio é absorvido no intestino e vários fatores aumentam sua absorção, incluindo vitamina D, ingestão protéica e meio ácido (NRC, 1993). Os fatores que reduzem a absorção de cálcio são: deficiência de vitamina D, excesso de fósforo, lipídio e fibra dietética e a presença de ácido fítico. A presença de ácido fítico, encontrado em vários grãos de cereais, impede a absorção do cálcio devido à formação de um sal insolúvel (Webster, 2007). Segundo Helland et al. (2006), o excesso de ácido fítico provocou problemas na coluna vertebral de salmão do Atlântico. O uso da fitase permite melhor aproveitamento de alguns minerais, aminoácidos e energia dos ingredientes levando ao melhor desempenho produtivo, redução no custo da ração e no impacto ambiental (Brandão, 2009). Resultados semelhantes foram encontrados na tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (Furuya et al., 2001; Bock et al., 2006) e na truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Sugiura et al., 2001), melhorando inclusive a disponibilidade de zinco e manganês.
A deficiência de cálcio pode causar descalcificação, osteoporose e distrofia osteóide nos peixes (Pezzato et al., 2004). Segundo Hossain & Furuichi (2000), a deficiência e o excesso de cálcio promovem redução do crescimento do peixe-escorpião *Sebastiscus marmoratus*. De forma semelhante, a ausência da suplementação de cálcio promove redução de crescimento em *Epinephelus coioides* (Ye et al., 2006), bem como redução da absorção do fósforo mesmo com a suplementação adequada deste mineral (Abbink et al., 2004); enquanto a suplementação de cálcio acima de 12 mg kg^{-1} na dieta prejudica a deposição de minerais (Ye et al., 2006).

Fósforo (P)

O fósforo é um macromineral essencial para o adequado crescimento e reprodução dos peixes, sendo importante constituinte estrutural do tecido esquelético (Roy & Lall, 2003) e encontrado em todas as células do organismo (Lovell, 1988). Este mineral também é constituinte do ácido nucléico e membranas celulares e está diretamente envolvido em todas as reações de produção de energia. O papel do fósforo no metabolismo de carboidratos, lipídios e aminoácidos está bem estabelecido (Lehninger et al., 2006; Webster, 2007).

A principal fonte de fósforo para os peixes é a dieta, pois a concentração de fosfato na água é baixa, sendo insuficiente apesar da rápida absorção via brânquias. O adequado nível de fósforo disponível em dietas para peixes pode melhorar o crescimento, utilização de nutrientes e deposição de minerais nos ossos (Furuya et al., 2008a). A disponibilidade do fósforo varia conforme o tipo de fosfato (NRC, 1993; Sarker et al., 2009), sendo observado em *Seriola quinqueradiata* que o fosfato monobásico tem maior absorção que o dibásico e tribásico (Sarker et al., 2009).

Estudos relacionados à exigência de fósforo vêm aumentando nos últimos anos, pois este elemento em quantidade desbalanceada na dieta não é aproveitado pelos peixes sendo então excretado para o ambiente, podendo provocar a eutrofização, comprometimento da qualidade da água e capacidade de suporte dos sistemas aqüícolas (Boyd & Queiroz, 2004).

Vários trabalhos relatam que a concentração de cálcio não tem efeito sobre a exigência de fósforo em bagre do canal, carpa e truta arco-íris, embora uma proporção adequada de Ca:P seja importante na dieta dessas espécies (NRC, 1993). A utilização de fósforo não sofreu interferência por um nível elevado de cálcio, em salmão do Atlântico *Salmo salar* (Vielma & Lall, 1998) e, segundo Paul et al. (2004), a proporção ideal de Ca:P para larvas de carpa indiana *Cirrhinus mrigala* foi de 1:4. Algumas exigências e relações de cálcio e fósforo na dieta dos peixes são apresentadas na Tabela 6.

Em relação à interação deste mineral, Webster (2007) relatou que o excesso de fósforo dietário pode reduzir a absorção tanto de cálcio quanto de fósforo. Por outro lado, quanto à deficiência de fósforo em dietas para peixes, Pezzato et al. (2004) relataram redução no crescimento e eficiência alimentar, aumento da gordura corpórea e baixa mineralização óssea. Estes efeitos foram observados em *Cichlasoma urophthalmus* em dietas contendo 0,5 g/kg^{-1} de fósforo (Chavez-Sanchez et al., 2000). Outros estudos demonstraram que a deficiência de fósforo provocou baixo crescimento e deformidade óssea nas carpas (Ogino & Takeda, 1976), além de redução de cinzas e deposição de minerais (Ca, P e Mg) nas nadadeiras, vértebras e opérculos e aumento de lipídio corporal em *Epinephelus coioides* (Ye et al., 2006) e em *Sparus macrocephalus* (Shao et al., 2008).

Vários estudos relacionam o efeito do fósforo e magnésio na resposta imune e resistência a doenças em peixes (Webster, 2007). Em *Coregonus lavaretus*, Jokinen et al. (2003) observaram que a suplementação da dieta com baixo nível de fósforo (4,4 g de P/kg^{-1}) foi responsável pela menor concentração de imunoglobulinas M (IgM) em relação a suplementação com alto nível de fósforo (14,9 g de P/kg^{-1}). Contudo, o nível de lisozima sérica e a produção de anticorpos não diferiram entre as dietas. Segundo Eya & Lovell (1998) a suplementação de 0,4% de fósforo na dieta é adequada para promoção do crescimento assim como para melhorar a resistência do bagre do canal contra a infecção por *Edwardsiella ictaluri*; enquanto uma suplementação de 0,5% de fósforo foi necessária para maximizar a produção de anticorpos.

Tabela 6. Exigência de cálcio (Ca) e fósforo (P), em percentual (%), para algumas espécies de peixes cultivadas.

Espécie	Mineral	%	Peso inicial e tempo de cultivo	Referência
Cichlassoma urophthalmus	Ca e P	1,8 e 1,5	0,4 g, 63 dias	Chavez-Sanchez et al. (2000)[1]
Cirrhinus mrigala	Ca e P	0,19 e 0,75	6,0 g, 90 dias	Paul et al. (2004)
Cyprinus carpio	Ca	0,34	-	Ogino & Takeda (1976)
C. Carpio	P	0,5-0,7	35,33 g, 46 dias	Furuya et al. (2008a)
C. Carpio	P_{disp}	0,6	-	Pezzato et al. (2004)
Epinephelus coioides	Ca e P	6 e 6	29,8 g, 10 semanas	Ye et al. (2006)
Ictalurus punctatus	Ca	0,45	-	Robinson et al. (1986)
I. punctatus	P_{disp}	0,8	-	Andrews et al. (1973)
Melanogrammus aeglefinus	P e P_{disp}	0,96 e 0,72	4,2 g, 12 semanas	Roy & Lall (2003)
Morone saxatilis	P	0,58	-	Dougall et al. (1996)
Oncorhynchus mykiss	P	0,25	53 g, 53 dias	Rodeshutscord (1996)[2]
O. mykiss	Ca	0,3		Pezzato et al. (2004)
O. mykiss	P_{disp}	0,6	-	Pezzato et al. (2004)
Oreochromis niloticus	P	0,74	0,95 g, 56 dias	Boscolo et al. (2005)
O. niloticus	P_{disp}	0,75	0,27 g, fase de alevino	Pezzato et al. (2006)
O. niloticus	P	1,10		Ribeiro et al. (2006)
Oreochromis sp.	P_{disp}	0,52	0,41 g, 46 dias	Furuya et al. (2008a)
Oreochromis sp.	P_{disp}	0,48	0,41 g, 120 dias	Furuya et al. (2008b)
O. niloticus x O. aureus	Ca	0,35-0,43	0,52 g, 8 semanas	Shiau & Tseng (2007)
Sparus aurata	P	0,54	11,45 g, 8 semanas	Shao et al. (2008)

[1, 2] : Concentração de 84 e 40-50 mg Ca/kg^{-1} água, respectivamente.

Magnésio (Mg)

O magnésio é essencial no metabolismo celular, sendo um cofator em muitas reações enzimáticas, como fosfoquinase, pirofosfatase e tioquinases (NRC, 1993; Pezzato et al., 2004; Webster, 2007). É exigido também no metabolismo do tecido ósseo, osmorregulação e transmissão neuromuscular (NRC, 1993; Pezzato et al., 2004). Cerca de 60% do magnésio são localizados no osso na forma de fosfatos, e aproximadamente 30% são encontrados em tecidos como fígado e músculo (Bijvelds et al., 1998; Webster, 2007).

O magnésio pode ser obtido da dieta ou pela água. Segundo Shearer & Asgard (1992) não há necessidade da suplementação deste mineral na dieta para truta arco-íris quando a água contém 46 mg L^{-1}. Em ambiente marinho, a suplementação de magnésio na dieta não é necessária (NRC, 1993).

As exigências de magnésio das espécies *Cyprinus carpio*, *Ictalurus punctatus*, *O. mykiss*, *Oreochromis* sp e *Salmo salar* variam em torno de 0,33 a 0,06 % da dieta (Knox et al., 1981; El-Mowafi & Maage, 1998; Pezzato et al., 2004). A deficiência de magnésio pode causar redução no crescimento, anorexia, letargia, flacidez dos músculos, diminuição dos níveis de magnésio no tecido e a degeneração das células epiteliais dos filamentos branquiais (NRC, 1993; Pezzato et al., 2004). Segundo Ogino & Chiou (1976), a deficiência de magnésio na carpa comum ocasionou redução no apetite, diminuição do crescimento, alta mortalidade, letargia e convulsões. Por outro lado, o excesso de magnésio na dieta pode interromper o metabolismo de cálcio e fósforo (Webster, 2007), causando hipercalcinose (NRC, 1993). Em salmão do Atlântico, El-Mowafi & Maage (1998) não verificaram diferença no crescimento quando da suplementação de 0,0 a 500,0 mg de Mg/kg^{-1} da dieta; porém essa incorporação promoveu redução no cálcio corporal dos peixes.

Quanto à imunidade em bagre do canal, Lim & Klesius (2003) não observaram efeito significativo na resistência à infecção por *E. ictaluri* com suplementação de até 1000,0 mg de sulfato de magnésio kg^{-1} da dieta, apesar destes autores terem observado aumento na quimiotaxia de macrófagos nos peixes alimentados com 400 mg Mg kg^{-1} na dieta. Em adição, salmão do Atlântico suplementados com magnésio e vacinados contra *Vibrio anguillarum* não houve diferença significativa para produção de anticorpos e atividades da lisozima e sistema complemento entre os diferentes níveis de suplementação (El-Mowafi et al., 1997).

b) Microminerais

Os microminerais importantes para os mamíferos, aves e peixes são cobalto, cobre, ferro, manganês, selênio, zinco, cromo, iodo, arsênio, molibdênio, flúor, chumbo, níquel, silício, vanádio e lítio, sendo que sobre os últimos oito as informações são limitadas em relação a peixes (Watanabe et al., 1997). As informações relativas às exigências de microminerais em peixes são sumarizadas na Tabela 7.

Tabela 7. Exigência dos microminerais (mg/kg^{-1} da dieta) para o crescimento de algumas espécies de peixes cultivadas.

Espécie	Mineral	Exigência (mg kg^{-1})	Peso inicial e tempo de cultivo	Referência
C. carpio	Cobre	3,0	-	Ogino & Yang (1980)
E. malabaricus	Cobre	4-6	13,35 g, 8 semanas	Lin et al. (2008b)
I. punctatus	Cobre	5	alevino, 13 semanas	Wilson & Gatlin III (1986)
O. niloticus x O. aureus	Cobre	4	0,79 g, 8 semanas	Shiau & Ning (2003)
S. salar	Cobre	5,0	-	Lall & Hines (1987)
C. carpio	Ferro	150,0	-	Pezzato et al. (2004)
I. punctatus	Ferro	30,0	-	Gatlin III & Wilson (1986)
O. mykiss	Ferro	60,0	-	Pezzato et al. (2004)
I. punctatus	Iodo	1,1	-	Pezzato et al. (2004)
O. mykiss	Iodo	1,1	-	Pezzato et al. (2004)
C. auratus	Manganês	13,77	3,21 g, 68 dias	Pan et al. (2008)
Epinephelus coioides	Manganês	15*	12,9 g, 8 semanas	Ye et al. (2008)
I. punctatus	Manganês	2,4	-	Gatlin III & Wilson (1984)
O. mykiss	Manganês	13,0	-	Ogino & Yang (1980).
O. niloticus	Manganês	12,0	-	Pezzato et al. (2004)
O. niloticus x O. aureus	Manganês	7	0,64 g, 8 semanas	Lin et al. (2008a)
I. punctatus	Selênio	0,09-0,28**	1,7 g, 9 semanas	Wang & Lovell (1997)
Epinephelus coioides	Selênio	0,7	12 g, 8 semanas	Lin & Shiau (2005)
Clarias gariepinus	Selênio	0,3	68,7 g, 12 semanas	Abdel-Tawwab et al. (2007)
C. carpio	Selênio	0,25	-	Pezzato et al. (2004)
O. mykiss	Selênio	0,15-0,38	-	Hilton et al. (1980)
C. carpio	Zinco	15,0-30,0	-	Ogino & Yang (1979)
I. punctatus	Zinco	20,0	-	Gatlin III & Wilson (1983)
O. mykiss	Zinco	0,15-0,30	-	Ogino & Yang (1978)
O. niloticus	Zinco	44,5, 79,5***	10	Sá et al. (2004)

*:Suplementada na dieta basal contendo 4 mg/kg^{-1}; **:Conforme a fonte de selênio; ***:44,5 para ganho de peso e 79,5 para saturação óssea de zinco.

Cobre

O cobre é componente de várias enzimas, como a citocromo-oxidase, necessária para o transporte de elétrons durante a respiração aeróbica (McDowell, 1992; Pezzato et al., 2004); lisil-oxidase que catalisa a formação do colágeno e elastina; ceruloplasmina que transporta ferro para a síntese de hemoglobina e superóxido dismutase que protege as células dos efeitos tóxicos no metabolismo do oxigênio e participa nas reações de defesa dos neutrófilos (NRC, 2001). Por estar envolvido no mecanismo de oxidação, sua deficiência leva a prejuízos no metabolismo oxidativo, podendo manifestar-se de múltiplas formas (Gonzáles & Silva, 2003), como falha na formação de colágeno (McDowell, 1992) e redução da atividade de superóxido dismutase (Babior et al., 1973).

A ausência ou a suplementação excessiva desse mineral pode prejudicar o estado nutricional dos peixes (Ferrari et al., 2004). A deficiência causa diminuição no teor de cobre nos tecidos (Pezzato et al., 2004), enquanto que o excesso deste produz efeitos negativos tais como a redução do crescimento (Clearwater et al., 2002), alterações nos parâmetros sanguíneos e comportamentais, e na atividade enzimática e reprodução (Roesijadi & Robinson, 1994; Nussey et al., 1995). Em peixes teleósteos, a exigência nutricional está estabelecida entre 3,0 e 10,0 mg Cu kg^{-1} de base seca na ração, dependendo da espécie, regime alimentar e estágio de vida. Por outro lado, o excesso, 16,0 e 32,0 mg Cu kg^{-1} na dieta, promoveu redução do crescimento e eficiência alimentar no bagre do canal (Wilson & Gatlin III, 1986).

O nível tóxico em peixes de água doce está entre 16,0 e 730,0 mg Cu kg^{-1} (Clearwater et al., 2002). Em salmonídeos, os efeitos tóxicos do cobre na alimentação podem incluir baixo crescimento (Clearwater et al., 2002), lesões severas no intestino (Handy, 1996), mudanças na proliferação das células intestinais (Berntssen et al., 1999; Lundebye et al., 1999), deposição de gordura no fígado (Handy et al., 1999), alterações hematológicas (Knox et al., 1982) e dificuldade nos movimentos (Campbell et al., 2002). Em tilápia do Nilo, o excesso de cobre provocou acúmulo no fígado (Ferrari et al., 2004) e intestino, redução no crescimento e consumo alimentar (Handy & Shaw, 2006). O fígado é o tecido de reserva mais importante para o cobre em relação aos demais (intestino, rim, brânquia e músculo) e concentrações maiores que a 50,0 mg de Cu/kg^{-1} da dieta reduziram a taxa de crescimento de *Sebastes schlegeli* (Kim & Kang, 2004).

Cromo

O cromo é requerido para metabolismo de carboidratos e lipídios, e também por potencializar a ação da insulina (NRC, 1993; Küçükbay et al., 2006). Como acontece com outros metais, este elemento pode ativar a tripsina (Webster, 2007).

A suplementação de cromo em carpa melhorou a utilização de glicose, provavelmente pela modulação da atividade da insulina (Hertz et al., 1989). Em *O. niloticus*, a dieta suplementada com óxido de cromo melhorou o crescimento, retenção energética e deposição de glicogênio no fígado (Shiau & Chen, 1993), além de aumentar a absorção de zinco em truta arco-íris

(Küçükbay et al., 2006). Gatta et al. (2001) relataram que a resposta imune na truta arco-íris alimentada com cromo foi dose e tempo dependentes, e a dose adequada para melhor atividade fagocítica do macrófago após seis semanas de criação foi 2,3 mg Cr kg^{-1} dieta. Em *P. mesopotamicus*, após 15 dias de criação em densidade elevada, Fujimoto et al. (2007) observaram redução no número de linfócitos circulantes nos peixes que receberam baixa concentração de cromo dietário, sendo que os níveis de 12 e 18 mg Cr kg^{-1} de ração foram mais benéficos aos animais. Varandas (2009), ao avaliar a inclusão dos níveis de 0, 12 e 36 mg de Cr/kg^{-1} de ração, na forma de cromo trivalente, não observou diferença para o desempenho produtivo e para a maioria dos parâmetros hematológicos avaliados.

A deficiência de cromo pode ocasionar redução na tolerância à glicose e comprometimento da síntese de glicogênio e lipídio a partir da glicose (Pezzato et al., 2004). Níveis tóxicos de cromo na água podem prejudicar a defesa orgânica de *O. mossambicus* reduzindo o peso de baço e a porcentagem de linfócitos sanguíneos (Arunkumar et al., 2000), além de causar estresse oxidativo em *C. auratus* (Lushchak et al., 2008; Lushchak et al., 2009).

Ferro

O ferro participa do processo de respiração celular por meio de sua atividade de óxido-redução e transporte de elétrons, produção e funcionamento da hemoglobina, mioglobina, citocromos e outros sistemas enzimáticos (Carriquiriborde et al., 2004; Pezzato et al., 2004).

Em peixes, o ferro do ambiente é absorvido pelas brânquias, porém o alimento é a sua principal fonte (NRC, 1993; Carriquiriborde et al., 2004). A concentração deste micromineral exigido na dieta para a prevenção de sinais de deficiência em salmonídeos é de 60 a 100 mg/kg^{-1} (Andersen et al., 1996), 30 mg/kg^{-1} em bagre do canal (Gatlin III & Wilson, 1986) e 90 a 140 mg kg^{-1} em *Takifugu rubripes* (Zibdeh et al., 2001). Para o crescimento inicial da tilápia híbrida (*O. niloticus* x *O. aureus*), Shiau & Su (2003) encontraram uma exigência de 150 a 160 mg de Fé/kg^{-1} e 85 mg de Fe/kg^{-1} para citrato férrico e sulfato ferroso, respectivamente. Nesta espécie, os valores de hemoglobina, hematócrito e volume corpuscular médio foram maiores quando as dietas foram suplementadas adequadamente.

A deficiência de ferro nos peixes pode causar anemia microcítica e flacidez nos músculos (Pezzato et al., 2004). Em alevinos de tilápia de Nilo, a ausência de vitamina C e ferro na dieta propiciou o aparecimento de anemia microcítica e hipocrômica (Barros et al., 2002). Por outro lado, o excesso de ferro permite que este se ligue ao fósforo, formando um composto insolúvel, que pode provocar a deficiência do mesmo. Ainda, os níveis tóxicos do ferro podem levar a redução no crescimento, danos nos hepatócitos e aumento da mortalidade (NRC, 1993; Webster, 2007).

A suplementação de ferro na dieta é particularmente interessante devido ao efeito desse nutriente nas funções do sistema imune e na defesa do organismo contra diversos patógenos (Beisel, 1982; Bhaskaram, 1988), entretanto tanto a deficiência quanto o excesso deste micromineral pode levar ao comprometimento deste sistema (Lim et al., 2001). Em salmão do Atlântico, a suplementação de 25 a 100 mg de sulfato de ferro/kg^{-1} aumentou

a concentração de hemoglobina e o nível de ferro hepático (Andersen et al., 1997). Por outro lado, a deficiência de ferro para o bagre de canal aumentou a mortalidade dos peixes desafiados com *E. ictaluri*, embora a produção de anticorpo não tenha sido afetada pelo nível dietário de ferro (Lim & Klesius, 1997).

Manganês

O manganês está envolvido na formação óssea, coagulação sanguínea, função da insulina e síntese de colesterol. Atua ainda como cofator em diversos sistemas enzimáticos, como na síntese da uréia em amônia, metabolismo de proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucléicos, oxidação da glicose, ativação de quinases, transferases, hidrolases e decarboxilases e metaloenzimas como arginase, piruvato carboxilase e superóxido dismutase (Pezzato et al., 2004).

Nos peixes, a deficiência causa diminuição do crescimento, lesões na pele e nadadeiras, desenvolvimento de catarata e anormalidades esqueléticas (Lall, 2002; Pezzato et al., 2004). A deficiência de manganês e zinco reduz a atividade dos leucócitos “natural killer” em truta arco-íris, sendo este efeito revertido com a suplementação destes elementos (Inoue et al., 1998; Webster, 2007).

Selênio

O selênio é um micronutriente essencial para animais, incluindo os peixes, e a função mais conhecida é a de antioxidante, por ser cofator e parte integrante da enzima glutationa peroxidase, que protege células e membranas contra o estresse oxidativo (NRC, 1993; Pezzato et al., 2004). Além de antioxidante, o selênio é um constituinte da 5’-iodinase, enzima responsável pela ativação do tiroxina para a forma mais ativa, a triiodotironina (Ferreira et al., 2002). O selênio em conjunto com a vitamina E, previne distrofia muscular (Watanabe et al., 1997) e atua também contra toxicidade de metais pesados como cádmio, mercúrio (Halver & Hardy, 2002) e cromo (Orun et al., 2008).

O selênio pode ser encontrado nas formas inorgânica (selenito e selenato) e orgânica (selenometionina, selênio-metilselenometionina, selenocistina e selenocisteína). Entre eles, a forma orgânica apresentou maior digestibilidade no salmão do Atlântico (Bell & Cowey, 1989) e maior biodisponibilidade no bagre do canal (Wang & Lovell, 1997) e no híbrido *Morone chrysops* x *M. saxatilis* (Jaramillo et al., 2009).

O peixe absorve o selênio tanto da dieta como da água. Na água, geralmente a concentração é menor que 0,0001 mg/L^{-1}, sendo a toxicidade para os peixes acima de 0,04-0,13 mg/L^{-1} (Watanabe et al., 1997). O suprimento adequado de selênio na dieta dos peixes promove uma melhora no crescimento (Monteiro et al., 2007; Wang et al., 2007), sobrevivência e uniformidade do lote (Piedras et al., 2005). Por outro lado, a deficiência deste mineral pode causar redução no crescimento, distrofia muscular, anemia e hemorragia. Em excesso, o selênio pode reduzir o crescimento, eficiência alimentar e sobrevivência dos peixes (Watanabe et al., 1997). Em tilápia do Nilo, Gomes (2008) observou focos de necrose no fígado com consequente

prejuízo das funções hepáticas com a suplementação de 1,5 mg Se kg^{-1} da dieta. No bagre de canal, os níveis e as fontes de selênio influenciaram a resposta imune desta espécie. A suplementação de 0,20 mg Se kg^{-1} na forma de selenometionina e 0,40 mg Se/kg^{-1} na forma de selenito de sódio foram responsáveis por promover melhor resistência frente ao desafio com *E. ictaluri* (Wang et al., 1997). Em adição, a suplementação de selênio na dieta do bagre de canal como selênio-levedura foi responsável pelo aumento na aglutinação de anticorpos e da quimiotaxia dos macrófagos (Wang et al., 1997).

Para espécies nativas como a matrinxã *Brycon amazonicus*, a incorporação de 1,5 mg Se kg^{-1} de ração durante 60 dias produziu melhora no crescimento da espécie, além de aumentar a atividade da glutationa peroxidase, os níveis de glutationa reduzida e da hemoglobina, o que mostra a importância do selênio na proteção celular contra o estresse oxidativo e no aumento das defesas antioxidantes (Monteiro et al., 2007).

Zinco

O zinco atua como cofator em importantes sistemas enzimáticos, e também como componentes de metaloenzimas, como anidrase carbônica, fosfatase alcalina, álcooldesidrogenase, carboxipeptidases “a” e “b”, desidrogenaseglutâmica, D-glicerol-3-fosfato desidrogenase, desidrogenase lactato, desidrogenase málica, aldose, superóxido dismutase, ribonuclease e DNA polimerase (Pezzato et al., 2004). O zinco atua também como regulador de vários processos do metabolismo de carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucléicos (Lall, 2002; Pezzato et al., 2004). Esse mineral desempenha papel importante na ação de hormônios como insulina, glucagon, corticotrófico, entre outros. A absorção deste elemento ocorre no trato gastro-intestinal, brânquias, nadadeiras e pele (Tacon, 1990).

Nos peixes, os sinais de deficiência consistem na diminuição do crescimento, lesões na pele e nadadeiras, e desenvolvimento de catarata lenticular bilateral (Pezzato et al., 2004). Por outro lado, o excesso de cálcio, ácido fítico ou cobre inibem a absorção de zinco (Lall, 2002).

A suplementação de levedura desidratada de álcool (*Saccharomyces cerevisiae)* e zinco (óxido de zinco) como pró-nutrientes em ração inicial para *O. niloticus* resultou em interação positiva entre os mesmos no ganho de peso, conversão alimentar aparente e coeficientes de digestibilidade aparente, lipídio total e energia bruta, sendo que os níveis de 1% de levedura e 300mg Zn/kg^{-1} na dieta foram considerados adequados para suplementação (Hisano et al., 2004). Ainda, Signor (2007), trabalhando com levedura e zinco na dieta para tilápia do Nilo, verificou que níveis superiores a 4,0% de levedura autolisada e 400 mg de Zn/kg^{-1} dieta prejudicaram o metabolismo de minerais, enquanto que 6,0% de levedura autolisada e 600 mg de Zn kg^{-1} nas dietas prejudicaram o desempenho produtivo e o metabolismo de lipídeos nos peixes. Esse mesmo autor avaliou ainda os parâmetros hematológicos de tilápia do Nilo suplementadas com levedura autolisada e zinco na dieta, antes e após o estresse pelo frio, e observou que houve maior prejuízo na eritropoiese nos peixes que receberam dietas com 0,795:79,50 (Lev:Zn) e 14:1400 (Lev:Zn). Em adição, a ausência destes nutrientes promoveu uma diminuição significativa no hematócrito, leucócitos

totais e proteína plasmática total. Ainda, a suplementação de níveis elevados de levedura autolisada e zinco na dieta de tilápias provocou condições sub-ótimas de saúde e o estresse pelo frio determinou leucopenia, linfopenia, neutrofilia e monopenia.

Scarpa et al. (1992) observaram que a suplementação de 200 mg Zn kg^{-1} não induziu melhora na resistência de bagres do canal não imunizados para *Aeromonas hydrophila*. Entretanto, a suplementação de 5 mg de Zn/kg^{-1} na forma de metionina ou 30 mg Zn/kg^{-1} na forma de sulfato promoveu maior sobrevivência de bagre de canal após o desafio com *E. ictaluri* (Paripatananont & Lovell, 1995), enquanto uma maior produção de anticorpo foi obtida com a suplementação de 15 mg de Zn/kg^{-1} na forma de metionina ou 30 mg Zn/kg^{-1} ou mais na forma de sulfato.

C – Micro-organismos

a) Probióticos

A utilização dos microrganismos benéficos nos sistemas de criação faz parte de uma visão mais moderna da aqüicultura, que considera o viveiro de piscicultura como um sistema ecológico onde todos os níveis tróficos estão interligados. As bactérias possuem um papel importante na reciclagem dos nutrientes em todos os ecossistemas, atuando nos principais ciclos bioquímicos que sustentam a vida na terra.

O termo probiótico foi originalmente definido por Parker (1974) como “organismos e substâncias que contribuem para o balanço intestinal”. Esta definição mais tarde foi restrita para “suplemento alimentar de microrganismos vivos que afetam beneficamente o animal hospedeiro melhorando o equilíbrio da microflora intestinal” (Fuller, 1989). Na aqüicultura o conceito de probiótico é um pouco mais amplo e alguns autores consideram que os probióticos não precisam ser obrigatoriamente um suplemento alimentar. Na verdade, os métodos de aplicação são bastante variados, os probióticos podem ser simplesmente misturados na água de criação, adicionados na ração, banhos terapêuticos ou mesmo fornecidos indiretamente através de rotíferos e artêmia (Irianto & Austin, 2002).

Os microrganismos probióticos com potencial para a utilização na aqüicultura incluem bactérias gram-positivas e gram-negativas, leveduras e microalgas. Microrganismos inativados e seus componentes celulares também são considerados como probióticos por alguns autores (Isolauri et al., 2004), mas os resultados obtidos experimentalmente não são tão eficientes quanto aqueles obtidos com a utilização de células vivas (Panigrahi et al., 2005).

Trust et al. (1979) isolaram e identificaram microrganismos anaeróbicos do trato gastrointestinal de três espécies: da carpa-capim *Ctenopharyngodon idella*, do kinguio *Carassius auratus* e truta *Oncorhynchuis mykiss*. A lista incluía *Actinomyces*, *Bacterioides, Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* e *Peptostreptococcus*, gêneros encontrados também na microflora gastrointestinal de outros vertebrados. Ramirez & Dixon (2003) estudaram a produção de enzimas pela microflora intestinal do apaiari *Astronotus ocellatus*, acará bandeira *Pterophyllum scalare* e do linguado *Paralichthys lethostigma* e concluíram que as bactérias anaeróbicas

intestinais devem exercer um papel importante na digestão destes peixes, produzindo enzimas para a quebra e absorção de nutrientes.

A bactéria lática *Carnobacterium divergens* foi isolada do intestino do bacalhau do Atlântico *Ganus morhua* e fornecida na dieta de juvenis da mesma espécie (Gildberg et al., 1997). No final do experimento foi observada melhora na resistência a doenças e a bactéria lática conseguiu colonizar com sucesso o intestino dos peixes sobreviventes. A utilização de dois tipos de bactérias liofilizadas na dieta de juvenis de carpa comum aumentou a atividade de enzimas digestivas e melhorou o desempenho (Yanbo & Zirong, 2006). As bactérias utilizadas afetaram de forma diferente o desempenho e os melhores resultados foram obtidos com a combinação das duas.

Além de serem adicionadas nas rações, as bactérias benéficas também podem ser adicionadas na água para melhorar a ciclagem dos nutrientes e controlar a proliferação dos microrganismos indesejados (Irianto & Austin, 2002). Os probióticos podem ser utilizados também durante a incubação dos ovos, servindo como uma barreira efetiva contra os microrganismos patogênicos e, quando consumidos pelas larvas, atuando durante a colonização primaria do intestino (Farzanfar, 2006).

As leveduras, principalmente a *Saccharomyces cerevisae*, já mostraram bons resultados quando adicionadas em dietas para peixes. A utilização de levedura e de um probiótico comercial na proporção de 0,1% na dieta de larvas de tilápia do Nilo melhoraram significativamente o crescimento das larvas em relação a uma dieta controle (Lara-Flores et al., 2003). A suplementação com levedura desidratada e parcialmente autolizada em dietas de juvenis do híbrido *Morone chrysops* x *M. saxatilis* mostrou bons resultados de desempenho, conversão alimentar, sobrevivência e resistência contra bactérias (Li & Gatlin III, 2003, 2004, 2005). Nestes estudos, os níveis de inclusão variaram entre 1 e 4% das dietas, mas em geral 1% de inclusão já foi suficiente para proporcionar bons resultados.

Siwicki et al. (1994) estudaram o efeito de dois tipos de leveduras sobre a resposta imune não específica da truta arco-íris *O. mykiss* e verificaram que a porcentagem de linfócitos foi significativamente maior. No caso de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*), Gaiotto (2005) estudou a inclusão de dois níveis (2,5 e 5%) de levedura íntegra desidratada e seus derivados, parede celular de levedura e autolizado de levedura, na dieta e encontrou efeito significativo na composição de carcaça, taxa de crescimento específico, sobrevivência e consumo de ração.

Salvador (2008) avaliou o efeito da suplementação alimentar com 0,3% de parede celular de levedura e vacinação com extrato oleoso de *Streptococcus agalactiae* sobre o desempenho produtivo, indicadores fisiológicos e componente celular inflamatório de tilápia do Nilo. A suplementação com parede celular de levedura associada à vacinação não influenciou o desempenho produtivo dos peixes, embora tenha sido importante por incrementar a hematopoiese e leucopoiese, minimizando os problemas relativos à administração da substância isoladamente, além de promover melhora da resposta de defesa dos peixes, no que se refere à inflamação aguda.

Um probiótico comercial contendo *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Clostridium butyricum* e *Saccharomyces cerevisiae* foi avaliado em *Paralichthys olivaceus*, em sistema de recirculação. A incorporação do

probiótico na dieta ou na água de criação promoveu maior crescimento, sobrevivência e atividade da lisozima. Ainda, nos ensaios de estresse e de desafio com *Vibrio anguillarum*, os peixes apresentaram maior tolerância ao aumento de temperatura e maior sobrevivência, respectivamente, com a suplementação do probiótico, indicando que o emprego deste probiótico na água e na dieta pode melhorar a tolerância ao estresse e o sistema imune não-específico da espécie, promovendo uma maior resistência contra condições de estresse e patógenos (Taoka et al., 2006).

A alga unicelular *Tretaselmis suecica* foi utilizada na alimentação de camarões e como um aditivo alimentar para salmonídeos com bons resultados na redução de doenças bacterianas, sugerindo a presença de um componente antimicrobiano não especifico (Irianto & Austin, 2002).

O sucesso da utilização dos probióticos na dieta de peixes confirmou a importância dos microrganismos na saúde do sistema digestório e desempenho de peixes e outras espécies aquáticas (Gatesoupe, 1999; Irianto & Austin, 2002; Balcázar et al., 2006; Farzanfar, 2006; Kesarcodi-Watson et al., 2008). A possibilidade de estimular seletivamente o crescimento destas bactérias deu origem aos prebióticos.

b) Prebióticos

A utilização de ingredientes como um substrato seletivo para os microrganismos benéficos deu origem ao conceito de prebiótico. Os prebióticos são ingredientes não digestíveis da dieta que afetam positivamente o hospedeiro, estimulando de forma seletiva o crescimento e a atividade de bactérias benéficas para o trato gastrointestinal e melhorando a saúde do hospedeiro (Gibson & Roberfroid, 1995).

Para uma substância ser classificada com prebiótico, ela não pode ser hidrolisada ou absorvida na parte superior do trato gastrointestinal, e deve ser um substrato seletivo para bactérias comensais benéficas do cólon, afetando o crescimento ou o metabolismo, sendo capaz de alterar a microflora intestinal favorável e induzir efeitos benéficos intestinais ou sistêmicos ao hospedeiro (Dionizio et al., 2002). Os prebióticos também podem atuar indiretamente sobre o sistema imune e enzimático, pois estimulam o crescimento das populações de bactérias benéficas, que têm a capacidade de produzir substâncias com propriedades imunoestimulatórias e interagir com o sistema imune em vários níveis, incluindo produção de citocinas, proliferação de células mononucleares, fagocitose macrofágica, eliminação e indução de síntese de grandes quantidades de imunoglobulinas (Silva & Nörnberg, 2003).

As principais fontes de prebióticos utilizadas na alimentação animal são alguns açucares absorvíveis ou não, fibras, peptídeos, proteínas, alcoóis de açucares e os oligossacarídeos (Dionizio et al., 2002). Na nutrição animal, entre os prebióticos mais estudados como aditivos estão os frutoligossacarídeos, glucoligossacarídeos e mananoligossacarídeos (Budiño et al., 2004).

De acordo com Silva & Nörnberg (2003) os efeitos resultantes do uso dos prebióticos em dietas para animais monogástricos são evidenciados pelo crescimento de populações microbianas benéficas, melhora nas condições luminais, alterações nas características anatômicas do trato gastrointestinal,

aumento da eficiência do sistema imune e, em alguns casos, pela melhora no desempenho animal. Os prebióticos parecem afetar os peixes principalmente em situações de estresse, ajudando na recuperação e aumentando a sobrevivência, mas os resultados encontrados na literatura mostram que não é sempre que os prebióticos atuam como promotores de crescimento. Li & Gaitlin III (2004) avaliaram a inclusão do prebiótico comercial Grobiotic™AE (1 e 2%) em dietas para juvenis de *Morone chrysops* x *M. saxatilis* e verificaram que a conversão alimentar foi significativamente melhor com a dieta contendo prebiótico. Neste mesmo estudo também foi realizado um desafio com bactérias e os peixes que receberam as dietas contendo prebiótico apresentaram sobrevivência significativamente maior em relação à dieta basal. Posteriormente, Li & Gaitlin III (2005) testaram a eficiência do prebiótico Grobiotic®-A (2% de inclusão) para juvenis de *Morone chrysops* x *M. saxatilis* expostos à infecção crônica por *Mycobacterium marinum* e constataram a utilização do prebiótico não afetou o ganho de peso e conversão alimentar, mas elevou significativamente a sobrevivência dos peixes.

A inclusão de 0,05% do prebiótico comercial Flavofeed® na dieta de juvenis de tilápia do Nilo mantidos em condições controladas de laboratório também não afetou significativamente o desempenho, eficiência alimentar e parâmetros hematológicos sanguíneos, mas foram observadas alterações significativas nas características do epitélio do intestinal e menor deposição de gordura visceral nos peixes alimentados com prebiótico, evidenciando alterações fisiológicas provocadas pelo uso deste aditivo (Fabregat et al., 2008). Mesmo quando não ocorrem alterações hematológicas significativas, como observado no estudo com juvenis de tilápia do Nilo, a utilização de prebióticos pode promover a diminuição nas populações de bactérias patogênicas. Determinados oligossacarídeos podem atuar diretamente sobre estas populações, ligando-se às fímbrias utilizadas para fixação e tornando-as indisponíveis para a aderência no trato gastrointestinal, fazendo com que as bactérias sejam eliminadas por exclusão competitiva (Spring et al., 2000; Gibson & Roberfroid, 1995).

Mananoligossacarídeos

Dentre os oligossacarídeos mais estudados como aditivos na alimentação animal encontram-se: frutoligossacarídeos (FOS), glucoligossacarídeos (GOS) e mananoligossacarídeos (MOS) (Budiño, 2007).

Os mananoligossacarídeos (MOS) são pequenos polímeros de manose encontrados em maior quantidade em componentes de células de leveduras (Gibson & Roberfroid, 1995). Estes constituem uma rica fonte de manose disponível para adesão bacteriana, adsorvendo os patógenos e impedindo sua ligação à parede intestinal (Leslie, 1996; Gouveia et al., 2006).

Estudos com *Ancipenser oxyrinchus* mostram que a inclusão de 3 g MOS/kg^{-1} de ração promove melhora na taxa de crescimento específico, conversão alimentar e fator de condição (Pryor et al., 2003). De forma semelhante, Staykov et al. (2007) observaram melhora no ganho de peso, redução na taxa de conversão alimentar e na taxa de mortalidade de truta arco-íris suplementadas com 2000 ppm de MOS na ração em sistemas de tanques-rede e raceways. Ainda, em *Dicentrarchus labrax* houve aumento no

ganho de peso com a incorporação de 200 e 400 mg de MOS kg^{-1} de ração (Torrecillas et al., 2007).

Garcia (2008) avaliou o nível e o tempo de administração adequados de um suplemento constituído por 25% de mananoligossacarídeo e 30% de β-glucano sobre o desempenho produtivo e a homogeneidade do lote de tilápias criadas em tanques-rede e em condições de laboratório e observou que a suplementação desse composto na dieta de tilápias criadas em tanques-rede deve ser de 1000 mg de suplemento kg^{-1} de ração durante 36 dias.

Com relação ao efeito do MOS sobre as vilosidades intestinais, Salze et al. (2008) relataram que larvas de bijupirá *Rachycentron canadum* que receberam suplementação de 0,2% de MOS apresentaram vilosidades intestinais mais altas (2,04 m) em relação ao grupo controle. De forma semelhante, Garcia (2008) avaliou o efeito da suplementação alimentar com mananoligossacarídeo e β-glucano sobre vilosidades e criptas intestinais e digestibilidade de nutrientes da dieta de tilápias e observou que em 36 dias, a suplementação teve efeito prebiótico, reduzindo a profundidade de cripta, com a otimização da superfície de absorção intestinal representada pelo epitélio das vilosidades e com conseqüente melhora nos coeficientes de digestibilidade da proteína bruta nos peixes que receberam a suplementação com 500 mg MOS kg^{-1} de ração.

Sado (2008) avaliou a influência da suplementação de MOS no desempenho produtivo e parâmetros hematológicos de juvenis de pacu e não observou efeito nesses indicadores. Ainda, não houve diferença no perímetro das vilosidades intestinais de pacus suplementados com 0, 0,4 e 1,5% de MOS kg^{-1} de ração.

Glucanos

Os β-glucanos são macromoléculas formadas por blocos de glicose unidos através de ligações β (1-3) e β (1-6), sendo normalmente encontrados nas células de levedura e fungos e funcionam como um potente imunoestimulante em mamíferos (DiLuzio, 1985) e em peixes (Robertsen et al., 1990; Cook et al., 2003).

O mecanismo de ação do β-glucano se dá por meio de receptores específicos na superfície dos macrófagos (Jorgensen & Robertsen, 1995). Os macrófagos fazem parte da resposta imune não específica, reconhecendo e processando os antígenos, e ativando os linfócitos (Secombes & Fletcher, 1992). Nos peixes, o β-glucano pode favorecer a estimulação dos mecanismos de defesa não-específicos, estimulando a atividade fagocitária dos macrófagos e aumentando assim sua capacidade para eliminar os patógenos (Jorgensen et al., 1993; Jorgensen & Robertsen, 1995; Cook et al., 2003). O β-glucano é responsável também por promover a produção de proteínas líticas como a lisozima e as do sistema complemento (Engstad et al., 1992; Ortunõ et al., 2001; Paulsen et al., 2001; Biller, 2008), além de possuir atividades antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante (Liu et al., 2007; Dore et al., 2007).

Baixas concentrações de β-glucano são efetivas para estimular as funções imunes não-específicas em peixes (Robertsen et al., 1994; Santarém et al., 1997), enquanto altas concentrações podem exaurir as células

fagocíticas, prejudicando a potência e rapidez das respostas frente à exposição ao patógeno (Castro et al., 1999). A efetividade do β-glucano em peixes tem sido demonstrada na defesa contra as bactérias *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio salmonicida* e *Pasteurella piscicida* (Nikl et al., 1993) e *Aeromonas hydrophila* (Biller, 2008; Chagas et al., 2008a), além de aumentar a eficiência dos protocolos de vacinação por aumentar a produção de anticorpos contra proteínas presente na superfície das bactérias (Sherwood et al., 1987; Selvaraj et al., 2005; Whittington et al., 2005). Alguns resultados referentes às funções do β-glucano em peixes são sumarizados na Tabela 8.

Na literatura há vários estudos descrevendo o efeito benéfico do β-glucano sobre o desempenho produtivo dos peixes, principalmente quanto ao aumento da taxa de crescimento de diferentes espécies de peixes (Cook et al., 2003; Misra et al., 2006; Ai et al., 2007; Sealey et al., 2008; Dalmo & Bogwald, 2008), contudo, não existe uma explicação plausível para este fato. Os estudos de Whittington et al. (2005), Bagni et al. (2005), Welker et al. (2007) e Chagas et al. (2008a) contrapõem esses achados, visto que eles não observaram nenhum aumento significativo no crescimento dos peixes suplementados com β-glucano na dieta (Tabela 8). Essa divergência nos resultados, em parte, é explicada pelas diferentes respostas obtidas na absorção do β-glucano, solúvel ou particulado, no intestino. O β-glucano na forma solúvel é prontamente absorvido pelo intestino, enquanto que para o particulado não há evidências que este seja absorvido pelo intestino dos peixes ou digerido por enzimas que degradam o β-glucano (Dalmo & Bogwald, 2008). Em adição, essa divergência pode ser originada também em função do método de administração, quantidade de β-glucano incorporada na dieta, duração da administração, temperatura ambiental e a da espécie em estudo (Cook et al., 2003; Abreu, 2007; Sealey et al., 2008; Dalmo & Bogwald, 2008).

No híbrido *Morone chrysops* x *M. saxatilis* a suplementação de β-glucano na dieta por seis semanas não promoveu efeito significativo sobre o desempenho produtivo da espécie, ocasionando redução do ganho de peso e conversão alimentar, além de não produzir melhoras na resistência às doenças e na atividade da lisozima (Jaramillo Junior & Gaitlin III, 2004).

O uso do β-glucano (G) e BAISM (B) como imunoestimulante e promotor de crescimento foi avaliado em juvenis de *Paralichthys olivaceus*. Neste estudo, Yoo et al. (2007) observaram que os peixes alimentados com as dietas G0,1+B0,9, G0,1+B1,9 e G0,15+B1,35 obtiveram maior ganho de peso, fator de condição e taxas de eficiência alimentar, crescimento específico e eficiência protéica. Ainda, a atividade de lisozima dos peixes alimentados com G0,1+B0,9 foi significativamente maior que o observado nos demais grupos. Estes resultados indicam que o nível de suplementação dietética ótima para juvenis de *Paralichthys olivaceus* é de 0,10% de β-1,3 glucano + 0,90% de BAISM.

Tabela 8. Efeitos da suplementação dietética de β-glucano em peixes.

Espécie	Glucano	Efeito	Referência
O. mykiss	β-glucano	Crescimento ↓ "Burst" respiratório → Lisozima → Sobrevivência após desafio com IHNV ↑	Sealey et al. (2008)
O. mykiss	β-1,3,1,6 glucano	"Burst" respiratório → Lisozima → Complemento → Anticorpos ↑	Verlhac et al. (1998)
O. niloticus	β-glucano	Lisozima →	Whittington et al. (2005)
I. punctatus	Célula íntegra/ subcomponentes de levedura	Crescimento → Lisozima → Complemento → Sobrevivência após infecção com *Edwardsiella ictaluri* →	Welker et al. (2007)
C. carpio	β-1,3-glucano + LPS	Anion superóxido ↑ Efeito adjuvante ↑ Complemento → Lisozima → Resistência a *Aeromonas hydrophila* ↑	Selvaraj et al. (2006)
C. batrachus	β-1,3-glucano (Sigma, St. Louis, MO, USA)	Lisozima ↑ Anion superóxido ↑ Resistência a *Aeromonas hydrophila* ↑	Kumari & Sahoo (2006)
Sander lucioperca	MacroGard (Biotec Pharmacon, Tromso, Norway)	Lisozima ↑ Imunoglobulina ↑ Atividade fagocítica ↑	Siwicki et al. (2009)
Pseudosciaena crocea	Célula íntegra/ subcomponentes de levedura	Crescimento ↑ Lisozima ↑ Complemento → "Burst" respiratório ↑ Proteção contra *Vibrio harveyi* ↑	Ai et al. (2007)
P. mesopotamicus	Nutricell (Biorigin, São Paulo, Brasil)	Crescimento → Hematologia → Resistência a *Aeromonas hydrophila* ↑	Schorer (2008)
C. macropomum	Betamune (Biorigin, São Paulo, Brasil)	Crescimento → Hematologia → Resistência a *Aeromonas hydrophila* ↑	Chagas et al. (2008a)

Falcon (2007) avaliou a suplementação de diferentes níveis de β-glucano (0,1%, 0,2%, 0,4% e 0,8%) e vitamina C (400 e 600 mg/kg^{-1} dieta) na dieta de tilápia do Nilo durante 60 dias e observou que essa suplementação não teve influência no desempenho produtivo da espécie.

Ainda, após o estímulo pelo frio e desafio com *A. hydrophila* observou-se melhores respostas imunes, determinadas pelos intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio, em tilápias suplementados com 0,1% de β-glucano e 600 mg de vitamina C kg^{-1} da dieta.

Com espécies nativas como o pacu, a suplementação de 0,1%, 0,2% e 0,3% de β-glucano nas rações por 90 dias não promoveu melhoras no desempenho produtivo desses juvenis e não provocou alterações nos parâmetros fisiológicos e indicadores de estresse. Entretanto, em 30 e 60 dias de suplementação com 0,1% de β-glucano houve maior sobrevivência dos pacus desafiados com *A. hydrophila* (Schorer, 2008).

Avaliando o desempenho produtivo de tambaquis suplementados com 0%; 0,1%; 0,2%; 0,4% e 0,8% β-glucano/kg^{-1} de ração, por 60 dias, Chagas et al. (2008a) não observaram diferença significativa no peso final, comprimento final, ganho de peso, conversão alimentar e sobrevivência. Ainda, essa suplementação não provocou nenhuma alteração significativa nos parâmetros hematológicos (hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos) e bioquímicos (glicose plasmática, proteínas totais e albumina) estando estes valores dentro da faixa considerada ideal para peixes hígidos. Portanto, os níveis de β-glucano avaliados não induziram uma resposta fisiológica diferenciada no tambaqui (Chagas et al., 2008b).

Existem evidências de que o aumento na taxa de crescimento dos peixes, resposta ao estresse e resistência a doenças são dependentes dos níveis de β-glucano incorporado na ração, da via de administração, bem como do período de fornecimento da dieta (Dalmo & Bogwald, 2008).

Abreu (2007) avaliou as vias de administração do β-glucano, injeção intraperitoneal ou adicionado à ração, em pacus e observou que não houve alteração hematológica em ambas as vias testadas. Por outro lado, com a injeção intraperitoneal de β-glucano houve um aumento da atividade respiratória dos leucócitos após quatro (10µg de β-glucano) e 10 dias (50µg de β-glucano), bem como maior atividade de lisozima nos peixes injetados com 10µg de β-glucano e nos que receberam a suplementação de 1,0% de β-glucano na dieta.

Com relação ao tempo adequado para administração (7, 15, 30 e 45 dias) das dietas suplementadas de 0,1% de β-glucano e 600 mg de vitamina C kg^{-1} dieta para juvenis de tilápia do Nilo, Falcon (2007) relatou que o tempo de 15 dias ou mais proporcionou aumento da resistência orgânica dos peixes frente aos desafios: estímulo pelo frio, estresse por transporte e *Aeromonas hydrophila*.

Segundo Biller (2008) a suplementação de 0,1% de β-glucano por sete dias na dieta do pacu promoveu maior sobrevivência dos peixes desafiados com *A. hydrophila*, e houve um aumento das células leucocitárias, número de trombócitos e níveis de proteína total. Em sete dias de suplementação com 1% de β-glucano, ocorreu um aumento da atividade respiratória dos leucócitos, da atividade da lisozima e da atividade de proteínas do sistema complemento dos pacus inoculados com *A. hydrophila*. Essa autora enfatiza que a utilização do β-glucano melhorou o sistema imune inato desta espécie.

Em ensaios de desafio com a bactéria *A. hydrophila*, observou-se que tambaquis que não receberam a suplementação e os que receberam 0,4 e 0,8% de β-glucano apresentaram maior mortalidade, após o desafio. Entretanto, o grupo de peixes que recebeu a menor suplementação de β-

glucano (0,1%) foi o que apresentou menor taxa de mortalidade. Decorridas 24 horas após o desafio, observou-se ocorrência de características clínico-patológicas típicas de aeromoniose (Figura 12), tais como: petéquias hemorrágicas, grandes lesões na superfície do corpo, distensão da cavidade abdominal, peixes isolados do cardume, coloração enegrecida, hemorragia nas nadadeiras e órgãos internos (Chagas et al., 2008a).

A administração de dietas suplementadas com β-glucano mostrou ser benéfica na prevenção dos efeitos negativos do estresse em peixes, ressaltando a importância do emprego de imunoestimulantes como medida profilática (Anderson, 1992; Selvaraj et al., 2005). Em *O. mykiss*, houve supressão das respostas primárias e secundárias do estresse de transporte, sugerindo que baixos níveis de β-glucano poderiam ser administrados na dieta antes do transporte para prevenir esses efeitos negativos (Jeney et al., 1997). Em pacus expostos ao estresse de captura, Abreu (2007) observou que a administração do β-glucano, por injeção intraperitoneal ou adicionado à ração, não afetou os parâmetros hematológicos do pacu, e não minimizou as alterações provocadas pelo estresse. Cinco minutos após o início do protocolo de estresse, houve um aumento da atividade respiratória dos leucócitos em pacus suplementados com 0,1% e 0,5% de β-glucano.

A vacinação é um método de imunoestimulação específica utilizada nos humanos e animais, incluindo os peixes (Iwama & Nakanishi, 1996). Na aqüicultura, as vacinas utilizadas consistem de preparações de bactérias vivas atenuadas, células mortas ou extratos celulares que são administrados aos peixes por injeção ou imersão (Gatlin III, 2002). No desenvolvimento de vacinas para peixes há necessidade de se compreender os mecanismos básicos da diferença entre a proteção alcançada por vacinas inativadas e a forte imunidade induzida por vacinas de DNA. No caso dos antígenos inativados, a maioria destes não irá induzir resposta imune adequada quando administrados na ausência de um adjuvante (Dalmo & Bogwald, 2008). Portanto, para aumentar a potência e eficácia da vacina, tem sido proposta a inclusão de imunoestimulantes como adjuvantes, e nesse sentido o estudo de Kamilya et al. (2006) mostrou um aumento da resposta do anticorpo após injeção de β-glucano como adjuvante em vacina de *A. hydrophila* inativada (Kamilya et al., 2006).

Pilarski et al. (2009) avaliaram o efeito da suplementação de diferentes níveis de β-glucano e da vacina oleosa com cepa inativada de *Flavobacterium columnare* sobre as respostas hematológicas e resistência de juvenis de tilápia. Estes autores relatam que para os peixes suplementados com β-glucano e vacinados houve diferença significativa na contagem total de células e trombócitos. A porcentagem das células brancas foi maior nos peixes vacinados e suplementados com 1,5% de β-glucano e com relação aos trombócitos, a porcentagem dessas células foi maior nos peixes vacinados e suplementados com 0,1% de β-glucano. Após o desafio com *F. columnare* observou-se maior porcentagem de mortalidade dos peixes no grupo suplementado com 3,0% de β-glucano e no grupo controle, enquanto nenhuma mortalidade foi registrada nos peixes alimentados com 0,1% de β-glucano. A administração de uma dose única de vacina de *F. columnare* por injeção intraperitonial e a suplementação de 1,5% de β-glucano foi eficaz para prevenir a ocorrência de columnariose.
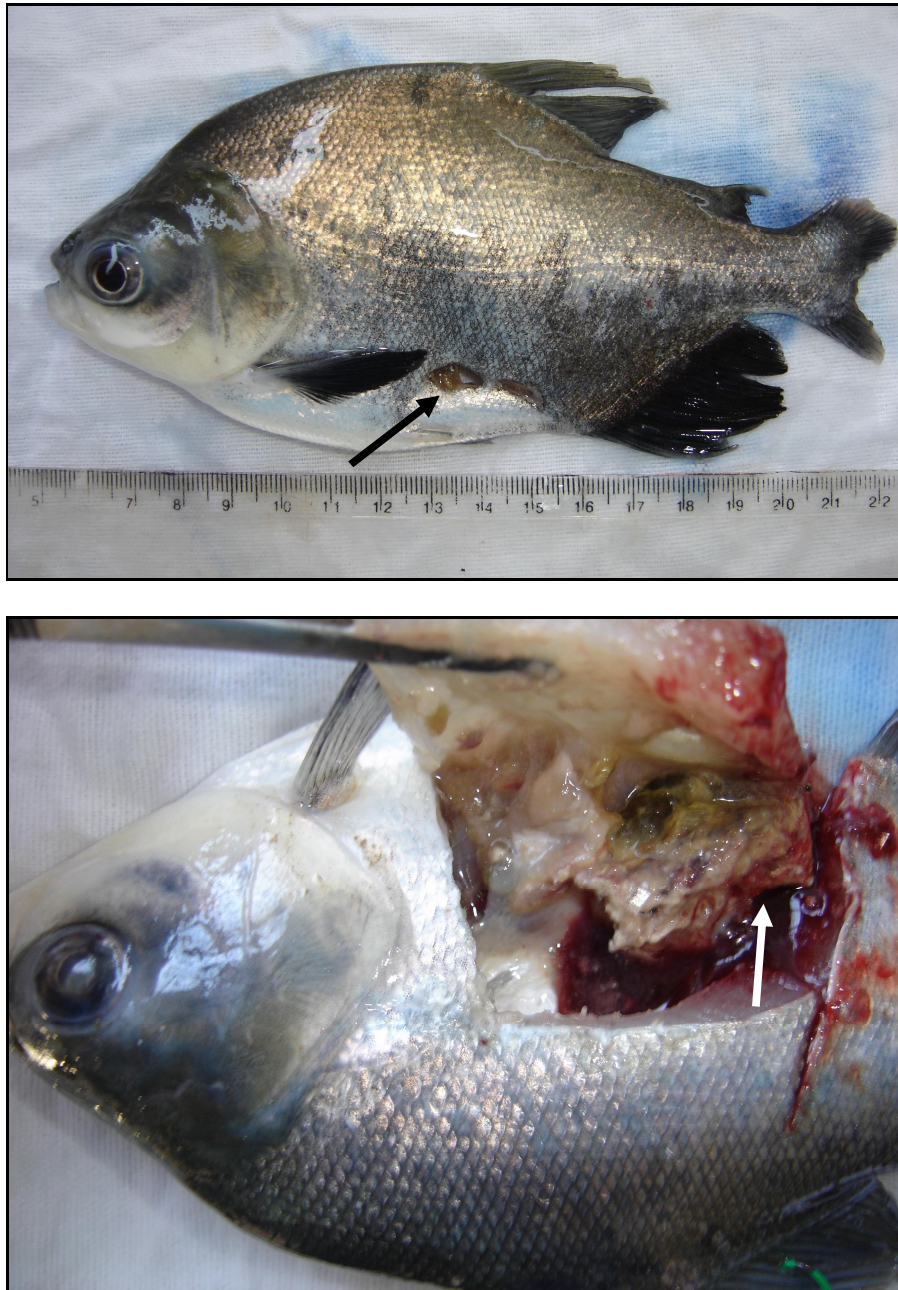
Figura 12. Espécimes de tambaqui apresentando sinais clínicos de ocorrência de *A. hydrophila*. (**A**) lesões na superfície do corpo e (**B**) hemorragia de órgãos internos. Sakabe (2008).

Nucleotídeos

Os nucleotídeos são compostos por uma base nitrogenada, um monossacarídeo pentose e um, dois ou três grupos fosfatos (Champe & Harvey, 1996). Eles possuem funções fisiológicas e bioquímicas essenciais que incluem numerosas reações de transferência de grupos fosfatos, tanto do ATP como de outros nucleotídeos trifosfatos, que suprem as reações endorgônicas, atuando também na formação de inúmeras coenzimas, tais como flavina adenina dinucleotídeo (FAD), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADP), coenzima A e S-adenosil-metionina e como efetores alostéricos e agonistas celulares (Carver & Walker, 1995; Cosgrove, 1998).

Os nucleotídeos não eram considerados nutrientes, pois era assumido que os organismos vivos poderiam sintetizar quantidades adequadas destes compostos exigidos para crescimento e desenvolvimento normais. Contudo, alguns tecidos têm uma capacidade limitada para realizar a síntese "de novo" e dependem de compostos fornecidos pela via de salvamento, tais como a mucosa intestinal, células hematopoiéticas e o cérebro (Yamamoto et al., 1997).

Na nutrição humana tem se utilizado o termo "semi' ou condicionalmente essencial para classificar os nucleotídeos, pois este nutriente somente torna-se essencial quando a síntese endógena não é suficiente para atender às funções normais (Carver & Walker, 1995). Por outro lado, Grimble & Westwood (2000) relatam que a deficiência dietética de nucleotídeo pode prejudicar as funções do fígado, coração, intestino e imune. Os nucleotídeos tornam-se essenciais em determinadas condições, pois o seu consumo pode poupar o organismo dos custos da síntese "de novo" e da via de salvação, consequentemente otimizando as funções dos tecidos e/ou órgãos. As condições indicadas para seu uso são: certos estados de doença, períodos de consumo limitado de nutrientes, crescimento rápido e na presença de fatores regulatórios ou de desenvolvimento que interferem na capacidade de síntese endógena (Carver & Walker, 1995).

Os efeitos benéficos da suplementação de nucleotídeos na dieta incidem sobre o crescimento, desenvolvimento do intestino delgado, metabolismo de lipídios, funções hepáticas, na maturação, ativação e proliferação dos linfócitos, assim como na fagocitose de macrófago e expressão genética de certas citocinas (revisto por Gil, 2002). López-Navarro et al. (1995) relatam que os nucleotídeos dietéticos são responsáveis por modularem o metabolismo dos nucleotídeos do fígado, e que este é o órgão mais importante para estocagem de nucleotídeos e transporte inter-órgão visando atender as necessidades fisiológicas (revisto por Gatlin III & Li, 2007).

Os nucleotídeos estão naturalmente presentes em todos os alimentos de origem animal e vegetal como nucleotídeos livres e ácidos nucléicos. Atualmente, vários suplementos de nucleotídeos são disponíveis no mercado, sendo estes mononucleotídeos e/ou oligonucleotídeos derivados da levedura (revisto por Gatlin III & Li, 2007).

A incorporação de misturas comerciais contendo nucleotídeos nas dietas de peixes tem proporcionado melhor ganho de peso, contudo é provável que esta resposta varie em função da espécie e dose administrada

(Bagni et al., 2005; Choudhury et al., 2005; Li & Gatlin III, 2006). Alguns estudos mostram melhor crescimento em larvas de tilápia (Ramadan & Atef, 1991), juvenis de truta arco-íris (Adamek et al., 1996) e de *Sciaenops ocellatus* (Gatlin III & Li, 2007). Por outro lado, para a maioria de juvenis e peixes sub-adultos, a influência da suplementação de nucleotídeos dietéticos no crescimento destes organismos tem se mostrado até certo ponto marginal (Li et al., 2004; Gatlin III & Li, 2007). Algumas respostas de desempenho dos peixes suplementados com nucleotídeos dietéticos são apresentadas na Tabela 9.

Os primeiros estudos com espécies nativas avaliando a incorporação de nucleotídeos na dieta de peixes foram realizados com juvenis de tambaqui, utilizando as concentrações de 0, 0,2 e 0,5% de nucleotídeos kg^{-1} de dieta durante durante 60 dias. Essa suplementação promoveu bom desempenho produtivo da espécie, cujo ganho de peso foi de aproximadamente 140 g no período, contudo, não foram observadas diferenças significativas no peso final, comprimento final, ganho de peso, conversão alimentar e sobrevivência de tambaquis (Chagas & Moraes, resultados não publicados). Estes resultados corroboram a hipótese de crescimento marginal para juvenis de peixes, conforme revisão de Gatlin III & Li (2007). Nesta revisão, os autores relatam que, possivelmente, os nucleotídeos dietéticos influenciam beneficamente o sistema imune dos peixes por compensar parcialmente o efeito inibitório da liberação do cortisol em situações de estresse. Em estudos conduzidos com truta arco-íris, Leonardi et al. (2003) observaram que a suplementação de nucleotídeos na dieta reduziu os níveis de cortisol após 90-120 dias de alimentação, tanto nos peixes saudáveis quando nos infectados com o vírus da necrose pancreática infecciosa. Esta redução do estresse também resultou no aumento da resistência a doenças nos peixes desafiados.

A suplementação de nucleotídeos na dieta dos peixes tem influenciado as respostas imunes e aumentado à resistência a doenças (Burrels et al., 2001; Leonardi et al., 2003; Low et al., 2003). Em salmonídeos, essa suplementação aumentou a resistência dos peixes à infecções virais, bacterianas e parasitárias, e ainda melhorou a eficácia da vacinação e a capacidade osmorregulatória (Burrels et al., 2001). A suplementação de nucleotídeos pode influenciar ambos os componentes humoral e celular do sistema imune inato. Segundo Sakai et al. (2001), essa suplementação ocasionou estimulação do sistema complemento sérico pela via alternativa, da atividade de lisozima e da fagocitose em carpa comum (Tabela 9).

No caso do híbrido *Morone chrysops* x *M. saxatilis*, Li et al. (2004) relataram que a suplementação com nucleotídeos por oito semanas antes da exposição a *S. iniae* reduziu a mortalidade e quando os animais foram expostos novamente à bactéria a mortalidade foi de 52%, sendo esta significativamente menor que a observada nos peixes do grupo controle (83,8%).

Tabela 9. Efeitos da suplementação dietética de nucleotídeos em peixes cultivados.

Espécie	Nucleotídeo	Efeito	Referência
Oncorhynchus mykiss	Optimûn (Chemofarma, Augst, Switzerland)	↑ Sobrevivência após desafio com *V. anguillarum*, vírus da anemia infecciosa de salmão e *P. salmonis*	Burrels et al. (2001)
Oncorhynchus mykiss	Optimûn (Chemofarma, Augst, Switzerland)	Linfócitos B ↑ Resistência ao vírus da necrose pancreática ↑ Cortisol plasmático ↓	Leonardi et al. (2003)
Cyprinus carpio	RNA de levedura digerido por ribonuclease (Amano Seiyaku Co-op, Tokyo, Japan)	Fagocitose ↑ "Burst" respiratório ↑ Complemento ↑ Lisozima ↑ Infecção por *A. hydrophila* ↓	Sakai et al. (2001)
Sciaenops ocellatus	Optimûn (Chemofarma, Basel, Switzerland)	Crescimento → Cortisol → Resistência a *Amyloodinium ocellatum* →	Li et al. (2005)
Epinephelus malabaricus	Mixed-NT (Sigma, St. Louis, MO, USA)	Ganho de peso ↑ Produção de anion superóxido (O_2^-) ↑ Imunoglobulina ↑	Lin et al. (2009)
Scophthalmus maximus	Optimûn (Chemofarma, Augst, Switzerland)	Expressão de genes imune alterados em vários tecidos	Low et al. (2003)

Lin et al. (2009) avaliaram o efeito de uma mistura comercial de nucleotídeo contendo inosina monofosfato (IMP), adenosina monofosfato (AMP), guanosina monofosfato (GMP), uridina monofosfato (UMP) e citidina monofosfato (CMP), assim como a suplementação de cada nucleotídeo individualmente sobre o desempenho produtivo de *Epinephelus malabariscus*. Os resultados do estudo mostraram que os peixes alimentados com 1,5 g da mistura de nucleotídeos/kg^{-1} de ração ou com 1,5 g de AMP/kg^{-1} de ração obtiveram maior ganho de peso, produção de anion superóxido (O_2^-) e concentração de imunoglobulina, ressaltando ainda que tanto a mistura de nucleotídeos quando a suplementação de nucleotídeos na forma de adenosina monofosfato (AMP) foram mais benéficos sobre a resposta imune da garoupa do que os outros nucleotídeos fornecidos isoladamente.

Considerações finais

É inegável a importância dos nutrientes essenciais na dieta dos peixes, por sua ação sobre o desempenho produtivo e sistema imune, devendo ser fornecidos na dieta por serem sintetizados de forma limitada pelos peixes. Com relação aos imunoestimulantes, com seu potencial para melhorar a função imune e aumentar a resistência a doenças, a sua inclusão nas dietas dos peixes é vista como uma alternativa ao uso de antibióticos na aqüicultura. A incorporação desses suplementos nas dietas dos peixes possibilitará a manutenção do seu equilíbrio orgânico em situações adversas encontradas em sistemas de criação intensiva. Para isso, concentrações de vitaminas, lipídios e minerais superiores às exigidas para crescimento normal são necessárias para estocagem e manutenção da função homeostática desde que não exceda os níveis seguros e resultem em efeitos tóxicos. Nessas determinações, se deve levar em consideração o tipo e função do nutriente, método e freqüência de alimentação, condição de criação e o estado de saúde dos peixes. No caso dos compostos que apresentam propriedades imunoestimulantes, as pesquisas ainda são recentes na aqüicultura mundial. No Brasil, as áreas de aplicação têm se expandido e o uso desses produtos na dieta das espécies nativas vem sendo avaliado. Contudo, algumas questões necessitam ser elucidadas como a dosagem e período de administração desses compostos para promoção da proteção dos peixes, bem como a recomendação do seu uso em período que antecedam os manejos mais intensos do processo de produção de peixes.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati (Caunep, Jaboticabal, SP), pela delicadeza e valiosa contribuição na revisão crítica deste capítulo.

Referências

ABBINK, W.; BEVELANDER, G. S.; ROTLLANT, J.; CANARIO, A. V. M.; FLIK, G. 2004. Calcium handling in *Sparus auratus*: effects of water and dietary calcium levels on mineral composition, cortisol and PTHrP levels. *J. Exp. Biol.*, 207:4077-4084.

ABDEL-TAWWAB, M.; MOUSA, M. A. A.; ABBASS, F. E. 2007. Growth performance and physiological response of African catfish, *Clarias gariepinus* (B.) fed organic selenium prior to the exposure to environmental copper toxicity. *Aquaculture*, 272:335-345.

ABREU, J. S. 2007. *Suplementação alimentar de pacu (Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887) com β 1,3 glicano: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura*. Tese (Doutorado) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

ABREU, J. S.; URBINATI, E. C. 2006. Physiological responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*) fed different levels of vitamin C and submitted to air exposure. *Acta Amazonica*, 36(4):519-524.

ADAMEK, Z.; HAMACKOVA, J.; KOURIL, J.; VACHTA, R.; STIBRANYIOVA, I. 1996. Effect of ascogen probiotics supplementation on farming success in

rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and wells (*Silurids glais*) under conditions of intensive culture. *Krmiva (Zagreb),* 38:11-20.

AFFONSO, E. G.; SILVA, E. C.; TAVARES-DIAS, M.; MENEZES, G. C.; CARVALHO, C. S. M.; NUNES, E. S. S.; ITUASSÚ, D. R.; ROUBACH, R.; ONO, E. A.; FIM, J. D. I.; MARCON, J. L. 2007. Effect of high levels of dietary vitamin C on the blood responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Comp. Bioch. Physiol.*, 147:383-388.

AI, Q.; MAI, K.; ZHANG, L.; TAN, B.; ZHANG, W.; XU, W.; LI, H. 2007. Effects of dietary β-1,3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish Shellfish Immunol.*, 22:394-402.

ALSO, D.; MATSUMOTO, J.; BROWN, S.; KRAAK, G. V. D. 2008. Retinoid requirements in the reproduction of zebrafish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 156:51-62.

AMAR, E. C.; KIRON, V.; SATOH, S.; OKAMOTO, N.; WATANABE, T. 2000. Effects of dietary b-carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries Sci.*, 66:1068-1075.

AMAR, E. C.; KIRON, V.; SATOH, S.; WATANABE, T. 2001. Influence of various dietary synthetic carotenoids on bio-defence mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac. Res.,* 32: 162-173.

ANDERSEN, F.; LYGREN, B.; MAAGE, A.; WAAGBØ, R. 1998. Interaction between two dietary levels of iron and two forms of the ascorbic acid and the effect on growth, antioxidant status and some non-specific immune parameters in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Aquaculture*, 161:437-451.

ANDERSEN, F.; LORENTZEN, M.; WAAGBØ, R.; MAAGE, A. 1997. Bioavailability and interactions with other micronutrients of three dietary iron sources in Atlantic salmon, *Salmo salar*, smolts. *Aquacult. Nutr.*, 3 (4):239-246.

ANDERSEN, F.; MAAGE, A.; JULSHAMN, K. 1996. An estimation of dietary iron requirement of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr. *Aquacult. Nutr.*, 2(1):41-47.

ANDERSON, D. P. 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 2:281-307.

ANDRADE, J. I. A.; ONO, E. A.; MENEZES, G. C.; BRASIL, E. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E. G.; 2007. Influence of diets supplemented with vitamin C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. *Comp. Biochem. Physiol.*, 146:576-580.

ANDREWS, J. W.; MURAI, T.; CAMPBELL, C. 1973. Effects of dietary calcium and phosphorus on growth, food conversion, bone ash and haematocrit levels of catfish. *J. Nutr.*, 103:766-771.

ANDREWS, J. W.; MURAI, T.; PAGE, J. W. 1980. Effects of dietary cholecalciferol and ergocalciferol on catfish. *Aquaculture* 19:49–54.

ARUNKUMAR, R. I.; RAJASEKARAN, P.; MICHAEL, R. D. 2000. Differential effect of chromium compounds on the immune response of the African mouth breeder *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Fish Shellfish Immunol.*, 10:667-676.

ASHTON, I.; CLEMENTS, K.; BARROW, S. E.; SECOMBES, C. J.; ROWLEY, A. F. 1994. Effects of dietary fatty acids on eicosanoid-generating capacity,

fatty acid composition and chemotactic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1214:253-262.

AZZI, A.; STOCKER, A. 2000. Vitamin E: non-antioxidant roles. *Progres. Lipid Res.*, 39:231-255.

BABIOR, B. M.; KIPNES, R. S.; CURNUTTE, J. T. 1973. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potencial bacterial agent. *JCI*, 52:741-744.

BACCONI, D. F. 2003. *Exigência nutricional de vitamina A para alevinos de tilápia do Nilo Oreochromis niloticus*. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

BAGNI, M.; ROMANO, N.; FINOLA, M. G.; ABELLI, L.; SACAPIGLIATI, G.; TISCAR, P. G.; SARTI, M.; MARINO, G. 2005. Short- and long-term effects of a dietary yeast beta-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Shellfish Immunol*., 18:311-25.

BAI, S. C.; LEE, K. 1998. Different levels of dietary DL-alpha-tocopherol acetate affect the vitamin E status of juvenille Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Aquaculture*, 161:405-414.

BAKER, E. M. 1967. Vitamin C requirements in stress. *Am. J.Clin. Nutr.*, 20(6):583-90.

BALCÁZAR, J. L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MÚZQUIZ, J. L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microb.*, 114:173-186.

BALFRY, S. K.; HIGGS, D. A. 2001. Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistence of finfish. In: LIM, C.; WEBSTER, C. D. (Ed.). *Nutrition and Fish Health*. Binghampton NY, USA: Food Product Press, p. 213-234.

BARNET, B. J.; CHO, C. Y.; SLINGER, S. J. 1982. Relative biopotency of dietary ergocalciferol and cholecalciferol and the role of and requirement for vitamin D in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *J. Nutr*., 2:2011-2018.

BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; KLEEMANN, G. K.; HISANO, H.; ROSA, G. J. M. 2002. Níveis de vitamina C e ferro para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Bras. Zootec*., 31(6):2149-2156.

BARROWS, F. T.; GAYLORD, G. T.; SEALEY, W. M.; PORTER, L.; SMITH, C. E. 2008. The effect of vitamin premix in extruded plant-based and fish meal based diets on growth efficiency and health of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 283:148-155.

BARTON, B. A. 2000. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. *N. Am. J. Aquac.*, 62:12-18.

BARTON, B. A.; BOLLING, H.; HAUSKINS, B.; JANSEN, C. R. 2000. Juvenile pallid (*Scaphirhynchus albuns*) and hybrid pallid x shovelnose (*S. albuns x S. platorynchus*) sturgeons exhibit low physiological responses to acute handling and severe confinement. *Comp. Biochem. Physiol.*, 126A:125-134.

BEISEL, W. R. 1982. Single nutrient and immunity. *Am. J. Clin. Nutr.*, 35:417-468.

BEITUNE, P. E.; DUARTE, G.; QUINTANA, S. M.; FIGUEIRÓ-FILHO, E. A.; VANNUCHI, H. 2003. Hipovitaminose A: cofator clínico deletério para o homem. *Medicina*, 36:5-15.

BELL, J. G.; ASHTON, I.; SECOMBES, C. J.; WEITZEL, B. R.; DICK, J. R.; SARGENT, J. R. 1996. Dietary lipids affets phospholipid fatty acid compositions, eicosanoid production and immune function in Atlantic salmon (*Salmo salar)*. *Prostaglandin, Leukot. Essent. Fat. Acids*, 54:173-182.

BELL, J. G.; COWEY, C. B. 1989. Digestibility and bioavailability of dietary selenium from fishmeal, selenite, selenomethionine and selenocystine in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 81:61-68.

BELO, M. A. A.; SCHALCH, S. H. C.; MORAES, F. R.; SOARES, V. E.; OTOBONI, A. M .M. B.; MORAES, J. E. R. 2005. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish (*Piaractus mesopotamicus*). *J. Comp. Pathol*., 133:146–154.

BERNTSSEN, M. H. G.; LUNDEBYE, A.-K.; MAAGE, A. 1999. Effects of elevated dietary copper concentrations on growth, feed utilization and nutritional status of Atlantic salmon *Salmo salar* L./fry. *Aquaculture*, 174:167–181.

BHASKARAM, P. 1988. Immunology of iron-deficient subjects. In: CHANDR, R. K. (Ed.). *Nutrition and Immunology*. New York: Alan R. Liss Inc., p. 149-168.

BIJVELDS, M. J. C.; VELDEN, J. A. V. D.; KOLAR, Z. I.; FLIK, G. 1998. Magnesium transport in freshwater teleosts - review. *J Exp Biol.*, 201:1981-1990.

BILLER, J. D. 2008. *Respostas fisio-patológicas e desafio por Aeromonas hydrophila em pacu alimentado com ração suplementada com 1,3 β-glucano*. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

BLANER, W. S.; OLSON, J. A. 1994. *Retinol and retinoic acid metabolism*. 2. ed. New York: Raven Press.

BLAZER, V. S. 1992. Nutrition and disease resistance in fish. *Annual Rev. Fish Dis.*, 2:309-323.

BLATT, D. H.; MD, S. W.; LEONARD, M. S.; TRABER, M. G. 2001. Vitamin E kinetics and the function of tocopherol regulatory proteins. *Nutrition*, 17(10):799-805.

BLOM, J.; DABROWSKI, K. 1995. Reproductive success of female rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* in response to graded dietary ascorbyl monophosphate levels. *Biol. Reprod*., 52:1073-1080.

BLOM, J.; DABROWSKI, K. 2000. Vitamin C requirements of the angelfish, Pterophylum scalare. *J. World Aquacult. Soc*., 31(1):115-118.

BLOMHOFF, R. 1994. Transport and metabolism of vitamin A. *Nutrition Rev*., 2(52):S13-S23.

BLOMHOFF, R.; GREEN, M. H.; BERG, J. B.; NORUM, K. 1991. Vitamin A metabolism: news perspectives on absorption, transport and storage. *Physiol Rev*, 71(4):951-990.

BOCK, C. L.; PEZZATO, L. E.; CANTELMO, O. A.; BARROS, M. M. 2006. Fitase e digestibilidade aparente de nutrientes de rações por tilápias-do-nilo. *R. Bras. Zootec.*, 35(6):2197-2202.

BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A.; BOMBARDELLI, R. A.; SIGNOR, A.; GENTELINI, A. L.; SOUZA, B. E. 2005. Exigência de fósforo para alevinos

de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Sci. Anim. Sci.*, 27(1):87-91.

BOWRY, V. W.; INGOLD, K. U.; STOCKER, R. 1992. Vitamin E in human low-density lipoprotein (When and how this antioxidant becomes a pro-oxidant). *Bioch. J.*, 288:341-344.

BOYD, C. E.; QUEIROZ, J. F. 2004. Manejo das condições do sedimento do fundo e da qualidade da água e dos efluentes de viveiros. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: Ed. TecArt, p. 25-44.

BOZZO, F. R. 2007. *Inflamação por Aeromonas hydrophila inativada e tioglicolato em Piaractus mesopotamicus suplementados com vitamina C, E ou sua associação*. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C. 2006. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amazonica*, 36(3):349-356.

BRANDÃO, L. V. 2009. Utilização de fitase em dietas para peixes. *PUBVET*, 3(5):Art#501.

BRANSDEN, M. P.; CARTER, C. G.; NICHOLS, P. D. 2003. Replacement of fish oil with sunflower oil in feeds for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): effect on growth performance, tissue fatty acid composition and disease resistance. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 135:611-625.

BROWN, P. B. 1988. Vitamin D requirement of juvenile channel catfish reared in calcium-free water. *Diss. Abst. Int. PT. B-Sci. Eng.*, 48-12.

BROWN, P. B.; ROBINSON, E. H. 1992. Vitamin D studies with channel catfish (*Ictalurus punctatus*) reared in calcium-free water. *Comp. Biochem. Physiol.*, 103(1):213-219.

BUCHMANN, K.; ROEPSTORFF, A.; WALLER, P. J. 1992. Experimental selection of mebendazole-resistant gill monogeneans from the european eel, *Anguilla-Anguilla* L. *J. Fish Dis.*, 15:393-400.

BUDDINGTON, R. K.; BUDDINGTON, K. K.; DENG, D. F.; HEMRE, G. I.; WILSON, R. P. 2002. A high retinol dietary intake increases its apical absorption by the proximal small intestine of juvenile sunshine bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). *J. Nutr.*, 2713-2716.

BUDIÑO, F. E. L. 2007. *Probióticos e prebióticos na alimentação de leitões*. Disponível em: <http:www.infobibos.com/Artigos/2007_4/suinos/index.htm>. Acesso em: 26 abr. 2009.

BUDIÑO, F. E. L.; THOMAZ, M. C.; KRONKA, R. N.; JÚNIOR, J. M. P.; SANTANA, A. E.; TUCCI, F. M.; FRAGA, A. L.; SCANDOLERA, A. J.; HUAYNATE, R. A. R. 2004. Influência da adição de probiótico e/ou prebiótico em dietas de leitões desmamados sobre as atividades das enzimas digestivas e parâmetros sangüineos. *Acta Sci. Anim. Sci.*, 26:529-536.

BURANAPANIDGIT, J.; BOONYARATPALIN, M.; WATANABE, T. 1989. Essential fatty acid requirement of juvenile seabass. *Lates calcarifer*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FEEDING AND NUTRITION IN FISH, 3., 1989, Toba, Japan. *Paper presented...* Toba, Japan.

BURRELS, C.; WILLIAM, P. D.; FORNO, P. F. 2001. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds 1. Effects on resistance to diseases in salmonids. *Aquaculture*, 199:159-169.

BUTTE, N. F.; LOPEZ-ALARCON, M. G.; GARZA, C. 2002. *Nutrient adequacy of exclusive breastfeeding for the term infant during the first six months of life*. Expert Consulation on the Optimal Duration of Exclusive Breastfeeding. Geneva: WHO.

CAHU, C. L.; ZAMBONINO INFANTE, J. L.; BARBOSA, V. 2003. Effect of dietary phospholipid level and phospholipid:neutral lipid value on the development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed a compound diet. *Br. J. Nutr.*, 90:21-28.

CAMPBELL, H. A.; HANDY, R. D.; SIMS, D. W. 2002. Increased metabolic cost of swimming and consequent alterations to circadian activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to dietary copper. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 59:768-777.

CARRIQUIRIBORDE, P.; HANDY, R. D.; DAVIES, S. J. 2004. Physiological modulation of iron metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed low and high iron diets. *J Exp Biol*, 207:75-86.

CARVER, J. D.; WALKER, W. A. 1995. The role of nucleotides in human nutrition. *J. Nutr. Biochem.*, 6:58-72.

CASTELL, J. D.; BELL, J. G.; TOCHER, D. R.; SARGENT, J. R. 1994. Effect of purified diets containing different combinations of arachidonic and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot. *Aquaculture*, 128:315-333.

CASTELL, J. D.; SINNHUBER, R. O.; WALES, J. H.; LEE, D. J. 1972. Essential fatty acids in the diet of rainbow trout (*Salmo gairdneri*): Growth, feed conversion and some gross deficiency symptoms. *J. Nutr.*, 102:77-86.

CASTRO, R.; COUSO, N.; OBACH, A.; LAMAS, J. 1999. Effect of different β-glucans on the respiratory burst of turbout (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 9:529-541.

CEREZUELA, R.; CUESTA, A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M. A. 2009. Effects of dietary vitamin D3 administration on innate immune parameters of seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish. Shellf. Immunol.*, 26:243-248.

CHAGAS, E. C.; MESQUITA-SAAD, L. S. B.; ARIDE, P. H. R.; MENDES, F. A.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L. 2003. Vitamins C, D and E in fish. In: VAL, A. L.; KAPOOR, B. G. (Ed.). *Fish Adaptations*. Enfield, NH: Science Publishers, p. 141–178.

CHAGAS, E. C.; NETO, J. D.; ALEXANDRE, R. O.; SAKABE, R.; PILARSKI, F.; MORAES, F. R. 2008a. Efeito do β-glucano sobre o crescimento e desafio com *Aeromonas hydrophila* em tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 10., 2008, Búzios. *Anais...* Búzios: ABRAPOA.

CHAGAS, E. C.; SAKABE, R.; PILARSKI, F.; MORAES, F. R. 2008b. Efeito do β-glucano sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos do tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 10., 2008, Búzios. *Anais...* Búzios: ABRAPOA.

CHAGAS, E. C.; VAL, A. L. 2003. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. *Pesq. Agropec. Bras.*, 38(3):397-402.

CHAGAS, E. C.; VAL, A. L. 2006. Ascorbic acid reduces the effects of hypoxia on the Amazon fish tambaqui. *J. Fish Biol.*, 69:608–612.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. 1996. *Bioquímica Ilustrada*. 2. ed. Porto Alegre: Artes médicas.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. 1997. *Bioquímica Ilustrada*. Porto Alegre: Artes médicas.

CHANG, H. R.; DULLOO, I. R.; VLADOIANU, I. R.; PIGUET, P. F.; ARSENIJEVIC, D.; GIRARDIER, L.; PECHERE, J. C. 1992. Fish oil decreases natural resistance of mice to infection with *Salmonella typhimurium. Metabolism*, 41:1-2.

CHATTERJEE, I. B. 1973. Evolution and the Biosynthesis of Ascorbic Acid. *Science*, 182:1271-1272.

CHATTERJEE, I. B.; MAJUNMDER, A. K; NANDI, B. K.; SUBRAMANIAN, N. 1975. Synthesis and major functions of vitamin C in animals. *Ann N Y Acad Sci*., 258:24-48.

CHAVEZ-SANCHEZ, C.; MARTINEZ-PALACIOS, C. A.; MARTINEZ-PEREZ, G.; ROSS, L. G. 2000. Phosphorus and calcium requirements in the diet of the American cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Günther). *Aquacult. Nutr.*, 6:1-9.

CHEN, R.; LOCHMANN, R.; GOODWIN, A.; PRAVEEN, K.; DABROWSKI, K.; LEE, K.-J. 2004. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). *Aquaculture*, 242:553–569.

CHIN, S. F.; LIU, W.; STORKSON, J. M.; HAY, L.; PARIZAM, W. 1992. Dietary sources of conjugated dienoico isomers of linoleic acid a newly recognized class of anticarcinogens. *Journal of Food Composition and Analysis*, 5:185-197.

CHOU, B.; SHIAU, S. Y. 1999. Both n-6 and n-3 fatty acids are required for maximal growth of juvenile hybrid tilapia. *North Am. J. Aquacult*., 61:13-20.

CHOUDHURY, D.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; KUMAR, S.; DAS, S. S.; MUKHERJEE, S. C. 2005. Dietary yeast RNA supplementation reduces mortality by *Aeromonas hydrophila* in rohu (*Labeo rohita* L.) juveniles. *Fish Shellfish Immunol.*, 19:281-91.

CLEARWATER, S. J.; FARAG, A. M.; MEYER, J. S. 2002. Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 132:269-313.

CLERTON, P.; TROUTAUD, D.; VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.; DESCHAUX, P. 2001. Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and on head kidney leukocyte. *Fish Shellfish Immunol*., 11:1-13.

COMBS, G. F. 1992. *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*. New York: Academic Press.

CONN, E. E.; STUMPF, P. K. 1984. *Introdução à Bioquímica*. 4. ed. São Paulo: Edgard Blucker.

COOK, M. T.; HAYBALL, P. J.; HUTCHINSON, W.; NOWAAK, B. F.; HAYBALL, J. 2003. Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. *Fish Shellfish Immun.*, 14:333-345.

COSGROVE, M. 1998. Nucleotides. *Nutrition*, 14:748-751.

COUTTEAU, P.; VAN STAPPEN, G.; SORGELOOS, P. 1996. A standard experimental diet for the study of fatty acid requirements of weaning and first ongrowing stages of the European sea bass *Dicentrarchus labrax* L.: comparison of extruded and extruded/coated diets. *Arch. Anim. Nutr.*, 49:49-59.

CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A.; ORTUNO, J.; MESEGUER, J. 2001. Vitamin E increases natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 11:293-302.

DABROWSKA, H.; DABROWSKI, K.; MEYER-BURGDORFF, K.; HANKE, W.; GUNTHER, K. D. 1991. The effect of large doses of vitamin C and magnesium on stress responses in common carp, *Cyprinus carpio*. *Comp. Bioch. Phys.*, 99A(4):681-685.

DABROWSKI, K. 1990. Gulonolactone oxidase is missing in teleost fish. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 371:207-214.

DABROWSKI, K. 2001. *Ascorbic acid in aquatic organisms*. Boca Raton, Florida: CRC Press.

DABROWSKI, K.; MATUSIEWICZ, M.; BLOM, J. H. 1994. Hydrolysis, absorption and bioavailability of ascorbic acid esters in fish. *Aquaculture*, 124(1-4):169-192.

DABROWSKI, K.; MOREAU, R.; EL-SAIDY, D.; EBELING, J. 1996. Ontogenic Sensitivity of Channel Catfish to Ascorbic Acid Deficiency. *J. Aquatic Health*, 8:22-27.

DALMO, R. A.; BOGWALD, J. 2008. β-glucans as conductors of immune symphonies. *Fish Shellfish Immun.*, 25:384-396.

DEDI, J.; TAKEUCHI, T.; SEIKAI, T.; WATANABE, T. 1995. Hypervitaminosis and safe levels of vitamin A for larval flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed *Artemia nauplii*. *Aquaculture*,133:135-146.

DEVLIN, T. M. 1998. *Manual de bioquímica com correlações químicas*. 4. ed. São Paulo: E. Blucher.

DEVLIN, T. 2002. *Manual de bioquímica e correlações clínicas*. 4. ed. São Paulo: E. Blucher.

DILUZIO, N. R. 1985. Update on the immunomodulating activities of glucans. *Springer Seminar Immunophatol.*, 88:387-400.

DIONIZIO, M. A.; BERTECHINI, A. G.; KATO, R. K.; TEIXEIRA, A. S. 2002. Prebióticos como promotores de crescimento para frangos de corte – desempenho e rendimento de carcaça. *Ciência Agrot.*, Edição Especial: 1580-1587.

DORE, G. C.; AZEVEDO, T. G.; SOUZA, M. R.; REGO, L. A.; DANTAS, J. C. M.; SILVA, F. R. F.; ROCHA, H. A. O.; BASEIA, I. G.; LEITE, E. L. 2007. Antiinflamatory, antioxidant and cytotoxic actions of β-glucan rich extract from *Geastrum saccatum* mushroom. *Int. Immunopharmacol.*, 7:1160-1169.

DOUGALL, S. D.; CURRY WOODS III, L.; DOUGLAS, W. L.; SOARES, H. J. 1996. Dietary phosphorus requirement of juvenile striped bass Morone saxatilis. *J. World Aquac. Soc.*, 27:82-91.

DOWD, P.; ZHENG, Z. B. 1995. On the mechanism of the anticlotting action of vitamin E quinone. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92(18):8171-8175.

DURVE, V. S.; LOVELL R. T. 1982. Vitamin C and disease resistance in channel catfish *(Ictalurus punctatus)*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci*., 39:948-951.

EITENMILLER, R. R.; LANDEN JUNIOR, W. O. 1999. *Vitamin analysis for the health and food sciences*. London: CRC Press.

EL-MOWAFI, A. F. A.; MAAGE, A. 1998. Magnesium requirement of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr in seawater-treated fresh water. *Aquacult. Nutr.*, 4(1):31-38.

EL-MOWAFI, A. F. A.; WAAGBØ, R.; MAAGE, A. 1997. Effect of low dietary magnesium on immune response and osmorregulation of Atlantic Salmon. *J. Aquat. Animal Health*, 9:8–17.

ENDREAS, S.; GHORBANI, R.; KELLEY, V. E.; GEORGILIS, K.; LONEMANN, G.; VAN DER MEER, J. M. V.; CANNOM, J. G.; ROGERS, T. S.; KLEMPNER, M. S.; WEBER, P. C.; SCHAEFFER, E. J.; WOLFF, M. S.; DINARELLO, C. A. 1989. The effect of dietary supplementation with ω-3 polyunsaturated fattys acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cell. *N. Engl. J. Med.*, 320:265-271.

ENGSTAD, R. E.; ROBERTSEN, E.; FRIVOLD, E. 1992. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish Shellfish Immunol.*, 2:287-297.

EO, J.; LEE, K. J. 2008. Effect of dietary ascorbic acid on growth and non-specific immune responses of tiger puffer, *Takifugu rubripes*. *Fish and Shell. Immun*., 25:611-616.

ERDAL, J. I.; EVENSEN, O.; KAURSTAD, O. K.; ILLEHAUG, A.; SOLBAKKEN, R.; THORUD, K. 1991. Relationship between diet and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after feeding various levels of ascorbic acid and omega-3 fatty acids. *Aquaculture*, 98: 363-379.

EYA, J. C.; LOVELL, R. T. 1998. Effects of dietary phosphorus on resistance on channel catfish to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *J. Aq. Anim. Health*, 10:28-34.

FABREGAT, T. E. H. P.; FERNANDES, J. B. K.; RODRIGUES, L. J.; CABRAL, K. G.; GARCIA, F.; SAKOMURA, N. K. 2008. Prebiótico Flavofeed® como suplemento dietético para juvenis de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*. In: CYRINO, J. E. P.; SCORVO-FILHO, J. D.; SAMPAIO, L. A.; CAVALLI, R. O. (Ed.). *Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura II*. 1. ed. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, p. 95-104.

FALCON, D. R. 2007. *Nível de suplementação de 1,3 β-glucano e vitamina C em dietas para tilápia do Nilo: desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos*. Tese (Doutorado) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

FAO. 2007. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2006*. Roma, p. 198.

FARZANFAR, A. 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *Immunol. Med. Microbiol.*, 48:149-158.

FERRARI, J. E. C.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; GONÇALVES, G. S.; HISANO, H.; KLEEMANN, G. K. 2004. Níveis de cobre em dietas para a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. *Acta Sci. Anim. Sci*, 26(4):429-436.

FERREIRA, K. S.; GOMES, J. C.; BELLATO, C. R.; JORDÃO, C. P. 2002. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. *Rev. Panam. Salud Publica/Pan. Am. J. Public Health*, 11(3):172-177.

FERREIRA, M. W. 2008. *Fontes de óleo na composição do músculo, lipoproteínas plasmáticas, imunidade inata e resistência de tilápia do Nilo* (*Oreochromis niloticus* L.). Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FLETCHER, T. C. 1997. Dietary effects on stress and health in aquaculture. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMMER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Ed.). *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 223-246.

FRACALOSSI, D. M.; ALLEN, M. E.; YUYAMA, L. K.; OFTEDAL, O. T. 2001. Ascorbic acid biosynthesis in Amazonian fishes. *Aquaculture*, 192:321-332.

FRACALOSSI, D. M.; ALLEN, M. E.; NICHOLS, D. K.; OFTEDAL, O. T. 1998. Oscars, *Astronotus ocellatus*, have a dietary requirement for Vitamin C. *J Nutr*, 128:1745-1751.

FRACALOSSI, D. M.; LOVELL, R. T. 1994. Dietary lipid sources influence responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to challenge with the pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *Aquaculture*, 119:287-298.

FRACALOSSI, D. M.; LOVELL, R. T. 1995. Growth and polar fatty acid composition of year-1 channel catfish fed various lipids sources at two water temperatures. *Prog. Fish Cult.*, 57:107-113.

FUJIMOTO, R. Y.; CARNEIRO, D. J. 2001. Adição de ascorbil polifosfato, como fonte de vitamina C, em dietas para alevinos de pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829). *Act. Scient.*, 23(4):855-861.

FUJIMOTO, R. Y.; CASTRO, M. P.; MARTINS, M. L.; MOARES, F. R.; MONFORT, C. F. K. 2007. Parâmetros sangüíneos de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) alimentados com dietas suplementadas com cromo trivalente em duas densidades de estocagem. *Acta Sci. Anim. Sci.*, 29:465-471.

FULLER, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bact.*, 66:365-378.

FURUITA, H.; ISHIDA, T.; SUZUKI, T.; UNUMA, T.; KUROKAWA, T.; SUGITA, T.; YAMAMOTO, T. 2009. Vitamin content and quality of eggs produced by broodstock injected with vitamins C and E during artificial maturation in Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 289:334-339.

FURUYA, W. M.; FUJII, K. M.; SANTOS, L. D.; SILVA, T. S. C.; SILVA, L. C. R.; MICHELATO, M. 2008a. Exigência de fósforo disponível para tilápia-do-nilo (35 a 100 g). *R. Bras. Zootec.*, 37(6):961-966.

FURUYA, W. M.; FUJII, K. M.; SANTOS, L. D.; SILVA, T. S. C.; SILVA, L. C. R.; SALES, P. J. P. 2008b. Exigência de fósforo disponível para juvenis de tilápia-do-nilo. *R. Bras. Zootec.*, 37(9):1517-1522.

FURUYA, W. M.; GONÇALVES, G. S.; FURUYA, V. R. B.; HAYASHI, C. 2001. Fitase na Alimentação da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): desempenho e Digestibilidade. *R. Bras. Zootec.*, 30(3):924-929.

GAIOTTO, J. R. 2005. *Utilização de levedura de cana-de-açúcar (Saccharomyces cerevisae) e seus subprodutos na alimentação de juvenis de pintado (Pseudoplatystoma coruscans)*. Dissertação (Mestrado) –

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

GALVIN, K.; MORRISSEY, P. A.; BUCKLEY, D. J. 1998. Effect of dietary α-tocopherol supplementation and gamma irradiation on α-tocopherol retention and lipid oxidation in cooked minced chicken. *Food Chemistry*, 62(2):185-190.

GAPASIN, R. S. J.; BOMBEO, R.; LAVENS, P.; SORGELOOS, P.; NELIS, H. 1998. Enrichment of live food with essential fatty acids and vitamin C: effects on milkfish (*Chanos chanos*) larval performance. *Aquaculture*, 162:269-286.

GARCIA, F. *Suplementação alimentar com β-glucano e mananoligossacarídeo para tilápias do Nilo em tanques-rede*. 2008. Tese (Doutorado) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

GARCIA, F.; PILARSKI, F.; ONAKA, E. M.; MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. 2007. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 271:39-46.

GATESOUPE, F. J. 1999. The use of probiotic in aquaculture. *Aquaculture*, 180:147-165.

GATESOUPE, F. J.; LEGER, C.; METAILLER, R.; LUQUET, P. 1977. Alimentation lipidique du turbot (*Scophthalmus maximus* L.). 1. Influence de la lonqueur de chaine des acides gras de la serie w3. *Annu. Hydrobiol.*, 18:89-97.

GATLIN III, D. M. 2002. Nutrition and health. In: HALVER, J. E.; HARDY, R. W. (Ed.). *Fish Nutrition*. San Diego, California: Academic Press, p. 671-702.

GATLIN III, D. M.; BAI, S. C.; ERICKSON, M. C. 1992. Effects of dietary vitamin E and synthetic antioxidants on composition and storage quality of channel catfish, *Ictalurus punctatus. Aquaculture*, 106:323-332.

GATLIN III, D. M.; LI, P. 2007. Nucleotides. In: NAKAGAWA, H.; SATO, M.; GATLIN III, D. M. (Ed.). *Dietary supplements for the health and quality of cultured fish*. UK: Cromwell Press, p. 193-209.

GATLIN III, D. M.; WILSON, R. P. 1983. Dietary zinc requirement of fingerling channel catfish. *J. Nutr.*, 114:630-635.

GATLIN III, D. M.; WILSON, R. P. 1986. Characterization of iron deficiency and the dietary iron requirement of fingerling channel catfish. *Aquaculture*, 52:191-198.

GATLIN III, D. M.; WILSON, R. P. 1984. Zinc supplementation of practical channel catfish diets. *Aquaculture*, 41:31-36.

GATTA, P. P.; THOMPSON, K. D.; SMULLEN, R.; PIVA, A.; TESTI, S.; ADAMS, A. 2001. Dietary organic chromium supplementation and its effects on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.*, 11:371-382.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.*, 125:401-412.

GIL, A. 2002. Modulation of the immune response mediated by dietary nucleotides. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 56(3):S1-S4.

GISBERT, E.; VILLENEUVE, L.; ZAMBONINO INFANTE, J. L.; QUAZUGUEL, P.; CAHU, C. L. 2005. Dietary phospholipids are more efficient than neutral

lipids for long chain polyunsaturated fatty acid supply in European sea bass *Dicentrarchus labrax* development. *Lipids*, 40:1–10.

GILDBERG, A.; MIKKELSEN, H.; SANDAKER, E.; RINGO, E. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hidrobiologia*, 352:279-285.

GOLDMAN, D. W.; PICKETT, W. C.; GOETZL, E. L. 1983. Human neutrophil chemotactic and degranulation activities of leukotriene B_5 (LTB_5) derived from eicosapentanoic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 117:282-288.

GOMES, G. R. 2008. *Suplementação com Selênio orgânico nas dietas de tilápias do Nilo (Oreochromis niloticus)*. Dissertação (Mestrado) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

GONZÁLEZ, F. H.; SILVA, S. C. 2003. *Introdução à Bioquímica Veterinária*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

GOSWAMI, U. C.; DUTTA, N. K. 1991. Vitamin A-deficient diet and its effects on certain haematological parameters of *Heteropneustes fossilis* a 3-4 dehydroretinol rich freshwater fish. *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 61:205-209.

GOUILLOU-COUSTANS, M. F.; BERGOT, P.; KAUSHIK, S. J. 1998. Dietary ascorbic acid needs of common carp (*Cyprinus carpio*) larvae. *Aquaculture*, 161:453-461.

GOUVEIA, E. M. F.; SILVA, I. S.; ONSELEM, V. J. V.; CORRÊA, R. A. C.; SILVA, C. J. 2006. Use of mannanoligosacharides as an adjuvant treatment for gastrointestinal diseases and its effects on *E. coli* inactivated in dogs. *Acta Cir. Bras.*, 21(4):23-26.

GRAHAM, G. L.; JONES, J. H. 1969. The histopathologic features of vitamin A deficiency in fish (*Carassius auratus*). *Trans. Amer. Microsc. Soc.*, 88(1):168-169.

GRANT, A.; BRIGGS, A. D. 1998. Use of ivermectin in marine fish farms: some concerns. *Mar. Poll. Bull.*, 36:566-568.

GRIFFIN, M. D.; XING, N.; KUMAR, R. 2003. Vitamin D and its analogs as regulators of immune activation and antigen presentation. *Ann. Rev. Nutr.*, 23:117-145.

GRIMBLE, G. K.; WESTWOOD, O. M. R. 2000. Nucleotides. In: GERMAN, J. B.; KEEN, C. L. (Ed.). *Nutrition and Immunology*: Principles and practice. Totowa, NJ: Humana Press, p. 135-144.

GROVE, S.; JOHANSEN, R.; DANNEVIG, B. H.; REITAN, L. J.; RANHEIM, T. 2003. Experimental infection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* with nodavirus: tissue distribution and immune response. *Dis. Aquat. Org.*, 53:211–221.

GRÜDTNER,V.S.; WEINGRILL, P.; FERNANDES, A.L. 1997. Aspectos da absorção no metabolismo do cálcio e vitamina D. *Rev. Bras. Reumatol.*, 37(3): 143-150.

GUIMARÃES. 2009. *Vitamina A em dietas para tilápia do Nilo*. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 92p.

HALILOGLU, H. I.; BAYIR, A.; SIRKECIOGLU, A. N.; ARAS, N. M.; ATAMANALP, M. 2003. Comparisons of fatty acid composition in some tissues of rainbow (*Oncorhynchus mykiss*) living in seawater and freshwater. *Food Chem.*, 86:55-59.

HALVER, J. E. 1972. The role of ascorbic acid in fish disease and tissue repair. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 38:79-92.

HALVER, J. E. 1995. Vitamim requeriment study techniques. *J. Applied Ichthyol.*, 11:215-228.

HALVER, J. E.; HARDY, R. W. 2002. *Fish Nutrition*. 3. ed. [S. l.]: Elsevier.

HALVER, J. E.; SMITH, R. R.; TOLBERT, B. M. 1985. Utilization of ascorbic acid in fish. *Ann. New York Acad. of Scien.,* 258:81-102.

HAMILTON, S. J. 2004. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Sci Total Environ.*, 326:1-31.

HAMRE, K.; LIE, O. 1995. α-Tocopherol levels in different organs of Atlantic salmon *(Salmu salar* L.) - Effect of smoltification, dietary levels of n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E. *Comp. Biochem. Physiol.*, 111(4):547-554.

HAMRE, K.; WAAGBO, R.; BERGE, R. K.; LIE, O. 1997. Vitamin C and E interact in juvenile atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Free Rad. Biol. & Med.*, 22:137-149.

HANDY, R. D. 1996. Dietary exposure to toxic metals in fish. In: TAYLOR, E. W. (Ed.). *Toxicology of Aquatic Pollution*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 29–60.

HANDY, R. D.; SHAW, B. J. 2006. Dietary cupper exposure and recovery in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquat. Toxicol.*, 76:111–121.

HANDY, R. D.; SIMS, D. W.; GILES, A.; CAMPBELL, H. A.; MUSONDA, M. M. 1999. Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. *Aquat. Toxicol.*, 47:23–41.

HANSEN, J. O.; BERGE, G. M.; HILLESTAD, M.; KROGDAHL, A.; GALLOWAY, T. F.; HOLM, H.; HOLM, J.; RUYTER, B. 2008. Apparent digestion and apparent retention of lipid and fatty acids in Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed increasing dietary lipid levels. *Aquaculture*, 284:159–166.

HARDIE, L. J.; FLETCHER, T. C.; SECCOMBES, C. J. 1991. The effect of dietary vitamin C on the immune response of Atlantic samon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 95:201-214.

HARRISON, E. H. 2005. Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. *Ann. Rev. Nutrition*, 25:87-103.

HELLAND, S.; DENSTADLI, V.; WITTEN, P. E.; HJELDE, K.; STOREBAKKEN, T.; SKREDE, A.; ASGARD, T.; BAEVERFJORD, G. 2006. Hyper dense vertebrae and mineral content in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with graded levels of phytic acid. *Aquaculture*, 261:603-614.

HENDERSON, R. J.; TOCHER, D. R. 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog. Lipid. Res.*, 26:281-347.

HENRIQUE, M. M. F.; GOMES, E. F.; GOUILLOU-COUSTANS, M. F.; OLIVA-TELES, A.; DAVIES, S. J. 1998. Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 161:415-426.

HENRY, H. L. 2001. The 25(OH)D(3)/alpha, 25(OH)(2)D(3)-24-Rhydroxylase: a catabolic or biosynthetic enzyme? *Steroids*, 66:391-398.

HEPHER, B. 1988. *Nutrition of pond fishes*. Cambridge: Cambridge University Press.

HERTZ, Y.; MADAR, Z.; HEPHER, B.; GERTLER, A. 1989. Glucose metabolism in the common carp (*Cyprinus carpio* L.): the effects of cobalt and chromium. *Aquaculture,* 76:255-267.

HILTON, J. W.; CHO, C. Y.; SLINGER, S. J. 1978. Effect of graded levels of supplemental ascorbic acid in practical diets fed to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Fish. Res. Board Can.*, 35:431-436.

HILTON, J. W.; HODSON, P. V.; SLINGER, S. J. 1980. The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Nutr*., 110:2527-2535.

HISANO, H.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; FREIRE, E. S.; GONÇALVES, G.; FERRARI, J. E. C. 2004. Zinco e levedura desidratada de álcool como pró-nutrientes para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). *Acta Sci.*, 26(2):171-179.

HOLICK, M. F. 1999. Vitamin D. In: SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M.; ROSS, A. C. (Ed.). *Modern nutrition in health and disease*. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 329-345.

HOLICK, M. F. 2004. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancer and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutrition*, 80(6):1678-1688.

HOSSAIN, M. A.; FURUICHI, M. 2000. Essentiality of dietary calcium supplement in fingerling scorpion fish (*Sebastiscus marmoratus*). *Aquaculture*, 189:155-163.

HU, C. J.; CHEN, S. M.; PAN, C. H.; HUANG, C. H. 2006. Effects of dietary vitamin A or β-carotene concentrations on growth of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Aquaculture*, 253:602-607.

HUANG, C. H.; HIGGS, D. A.; BALFRYC, S. K.; DEVLIN, R. H. 2004. Effect of dietay vitamin E level on growth, tissue lipid peroxidation and erythrocyte fragility of transgenic coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Comp. Bioch. Physiol.*, 139:199-204.

HUANG, C. H.; HUANG, S. L. 2004. Effect of dietary vitamin E on growth, tissue lipid peroxidation, and liver glutathione level of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*, fed oxidized oil. *Aquaculture*, 237:381–389.

HWANG, D. 1989. Essential fatty acids and immune response. *FASEB J.*, 3:2052-2061.

IBAMA. 2007. Estatística da pesca, ano 2006. In: IBAMA. *Reunião de consolidação da estatística pesqueira nacional*: ano 2006, 2007. Fortaleza.

IBEAS, C.; CEJAS, J. R.; FORES, R.; BADIA, P.; GOMEZ, T.; LORENZO, A.; HERNANDEZ, A. 1997. Influence of eicosapentaenoic to docosahexaenoic acid ratio (EPA/DHA) of dietary lipids on growth and fatty acid composition of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture*, 150:91-102.

INOUE, M.; SATOH, S.; MAITA, M.; KIRON, V.; OKAMOTO, N. 1998. Recovery from derangement of natural killer-like activity of leucocytes due to Zn or Mn deficiency in rainbow trout, *Oncorhynhus mykiss* (Walbaum), by the oral administration of these elements. *J. Fish Dis.*, 21:233-236.

IRIANTO, A.; AUSTIN, B. 2002. Probiotics in aquaculture. *J. Fish Dis.*, 25:633-642.

IRIE, T.; SEKI, T. 2002. Retinoid composition and retinal localization in the eggs of teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 131:209–219.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. 2004. Probióticos. *Best Practice Res. Clin. Gastroent.*, 18:299-313.

IWAMA, G.; NAKANISHI, T. 1996. *The fish immune system*. San Diego: Academic Press.

IWASHITA, M. K. P. 2008. *Influência da vitamina E na cinética do processo cicatricial induzido em tilápia do Nilo,Oreochromis niloticus*. Dissertação (Mestrado) – Centro de Aqüicultura da Unesp, Jaboticabal.

JARAMILLO JUNIOR, F.; GAITLIN III, D. M. 2004. Comparison of purified and practical diets supplemented with or without β-glucans e selenium on resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *J. World Aquac. Soc.*, 35:245-252.

JARAMILLO JUNIOR, F.; PENG, L.; GATLIN III, D. M. 2009. Selenium nutrition of hybrid stripped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) bioavailability, toxicity and interaction with vitamin E. *Aquacult. Nutr.*, 15:160-165.

JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D.; JENEY, Z.; ANDERSON, D. P. 1997. Prevention of stress in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*, 154:1-15.

JI, H.; OM, A. D.; YOSHIMATSU, T.; HAYASHI, M.; UMINO, T.; NAKAGAWA, H.; ASANO, M.; NAKAGAWA, A. 2003. Effect of dietary vitamin C and E fortification on lipid metabolism in red sea bream (*Pagrus major*) and black sea bream (*Acanthopagrus schlegeli*). *Fish. Sci.*, 69:1001-1009.

JOBLING, M.; KOSKELA, J.; SAVOLAINEN, R. 1998. Influence of dietary fat level and increased adiposity on growth and fat deposition in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss (Walbaum)*. *Aquacult. Res.*, 29:601-607.

JOHNSON, M. R.; AINSWORTH, A. J. 1991. An elevated dietary level of ascorbic acid fails to influence the response of anterior kidney neutrophils to *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish. *J. Aquatic Ani. Health*, 3:266-273.

JOKINEN, E. I.; VIELMA, J.; AALTONEN, T. M.; KOSKELA, J. 2003. The effect of dietary phosphorus deficiency on the immune responses of European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 15:159-168.

JORGENSEN, J. B.; ROBERTSEN, B. 1995. Yeast β-glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon *Salmo salar* L. macrophages. *Dev. Comp. Immunol.*, 19:43-57.

JORGENSEN, J. B.; SHARP, J. E.; SECOMBES, C. J.; ROBERSEN, B. 1993. Effect of a yeast-cell-wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol*., 3:267-277.

JUSTI, K. C.; HAYASHI, C.; VISENTAINER, J. V.; SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M. 2003. The influence of feed supply time on the fatty acid profile of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed on a diet enriched with n-3 fatty acids. *Food Chem.*, 80:489-493.

KAMILYA, D.; MAITI, T. K.; JOARDAR, S. N.; MAL, B. C. 2006. Adjuvant effect of mushroom glucan and bovine lactoferrin upon *Aeromonas hydrophila* vaccination in catla, Catla catla (Hamilton). *J. Fish Dis.*, 29:331-337.

KANAZAWA, A.; TESHIMA, S.; SAKAMOTO, M.; AWAL, M. A. 1980. Requirement of Tilapia zillii for essential fatty acids. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 46:1353-1356.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. 1997. Clinical bioquimistry of domestic animals. 5. ed. San Diego: Academic Press.

KATSUYAMA, M.; MATSUNO, T. 1988. Carotenoid and vitamin A and metabolism of carotenoids, β-carotene, canthaxanthin, astaxanthin, zeaxanthin, lutein and tunaxanthin in tilapia. *Comp. Bioch. Physiol.*, 90(1):131-139.

KESARCODI-WATSON, A.; KASPAR, H.; LATEGAN, M. J.; GIBSON, L. 2008. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274:1-14.

KIM, S.; KANG, J. 2004. Effect of dietary copper exposure on accumulation, growth and hematological parameters of the juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Mar. Environ. Res.*, 58:65–82.

KIMBALL, S.; FULEIHAN, G. H.; VIETH, R. 2008. Vitamin D: a growing perspective. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci*., 45(4):339-414.

KINSELLA, J. E.; LOKESH, B. 1990. Dietary lipids, eicosanoids and the immune system. *Crit. Care Med*., 18:S94-S113.

KIRON, V.; FUKUDA, H.; TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. 1995. Essential fatty acid nutrition and the defense mechanism in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 111A:361-367.

KNOX, D.; COWEY, C. B.; ADRON, J. W. 1981. Studies on the nutrition of salmonid fish. The magnesium requirement of rainbow trout (*Safmo gairdneri*). *Br. J. Nutr.*, 45:137-148.

KNOX, D.; COWEY, C. B.; ADRON, J. W. 1982. Effects of dietary copper and copper: zinc ratio on rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 27:111–119.

KOSHIO, S. 2007. Vitamins. In: NAKAGAWA, H.; SATO, M.; GATLIN III, D. M. (Ed.). *Dietary supplements for the health and quality of cultured fish*. UK: Cromwell Press, p. 35-46.

KOVEN, W. M.; PARRA, G.; KOLKOVSKI, S.; TANDLER, A. 1998. The effect of dietary phosphatidylcholine and its constituent fatty acids on microdiet ingestion and fatty acid absorption rate in gilthead sea bream, *Sparus auratus*, larvae. *Aquac. Nutr*., 4:39-45.

KRAGBALLE, K.; VOORHEES, J. J.; GOETZL, E. J. 1987. Inhibition by leukotriene B_5 of leukotriene B_4-induced activation of human keratinocytes and neutrophils. *J. Invest. Dermatol.*, 88:555-558.

KÜÇÜKBAY, F. Z.; YAZLAK, H.; SAHIN, N.; CAKMAK, M. N. 2006. Effects of dietary chromium picolinate supplementation on serum glucose, cholesterol and minerals of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult. Int.*, 14:259-266.

KUMARI, J.; SAHOO, P. K. 2006. Non-specific immune response of healthy and immunocompromised Asian catfish (*Clarias batrachus*) to several immunostimulants. *Aquaculture*, 255:133-141.

KUMARI, J.; SAHOO, P. K. 2006. Dietary β-1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batrachus* (L.). *J. Fish Dis.*, 29:95-101.

LALL, S. P. 2002. The Minerals. In: HALVER, J. E.; HARDY, R. W. (Ed.). *Fish Nutrition*. 3. ed. [S.l.]: Elsevier, p. 259-308.

LALL, S. P.; HINES, J. A. 1987. Iron and copper requirement of Atlantic salmon (*Salmo salar*) grown in sea water. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FEEDING AND NUTRITION OF FISH, 1987, Bergen, Norway. *Paper presented...*[S.l.: s.n.].

LANDOLT, M. L. 1989. The relationship between diet and immune response of fish. *Aquaculture*, 79:193-206.

LARA-FLORES, M.; OLVERA-NOVOA, M. A.; GUZMÁN-MENDEZ, B. E.; LÓPEZ-MADRID, W. 2003. Use of the bactéria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Sacccharomyces cerevisae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216:193-201.

LEE, K. J.; KIM, K. W.; BAI, S. C. 1998. Effects of differents diet levels of L-ascorbic acid on growth and tissue vitamin C concentration in juvenile korean rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Aquaculture Res.*, 29:237-244.

LEE, S.-M.; LEE, J. Y.; HUR, S. B. 1994. Essentiality of dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in Korean Rockfish, *Sebastes schlegeli*. *J. Korean Fish. Soc.*, 27:721-726.

LEE, T. H.; HOOVER, R. J.; WILLIAMS, J. D.; SPERLING, R. I.; RAVALESE, J.; SPUR, B. W.; ROBINSON, D. R.; COREY, E. J.; LEWIS, R. A.; AUSTEN, K. F. 1985. Effects of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. *N. Engl. J. Med.*, 312:1217-1224.

LEHNINGER, A. L. 1993. *Princípios de bioquímica*. São Paulo: Sarvier.

LEHNINGER, A. L.; COX, N.; YARBOROUGH, K. 2006. *Princípios de bioquímica*. 4. ed. São Paulo: Sarvier.

LEITCH, A. G.; LEE, T. H.; RINGEL, E. W.; PRICKETT, J. D.; ROBINSON, D. R.; PYNE, S. G.; COREY, E. J.; DRAZEN, J. M.; AUSTEN, K. F.; LEWIS, R. A. 1984. Immunologically induced generation of tetraene and pentaene leukotrienes in the peritoneal cavities of menhaden-fed rats. *J. Immunol.*, 132:2559-2565.

LEONARDI, M.; SANDINO, A. M.; KLEMPAU, A. 2003. Effect of a nucleotide-enriched diet on the immune system, plasma cortisol levels and resistance to infectious pancreatic necrosis (IPN) in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 23:52-59.

LEONARDO, J. M. L. O. 1999. *Efeito de suplementação com diferentes níveis de vitamina C (ácido ascórbico) em larvas de tilápia do Nilo Oreochromis niloticus de origem tailandesa durante a fase de reversão*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

LEONARDO, J. M. L. O.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; VARGAS, D. 1998. Efeito de diferentes níveis de vitamina C sobre a ocorrência de ectoparasitas em larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em processo de reversão sexual.. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 5., 1998, Maringá. *Anais....* Maringá: ABRAPOA.

LERAY, C.; NONNOTTE, G.; ROUBAUD, P.; LEGER. C. 1985. Incidence of (n-3) essential fatty acid deficiency on trout reproductive processes. *Reprod. Nutr. Dev.*, 25:567-581.

LESLIE, A. J. 1996. The ever-increasing role of biotechnology in the poultry industry: lessons from the past and thoughts for the future. *North American University Tour*, 65-85.

LI, M. H.; ROBINSON, E. H. 1999. Dietary ascorbic acid requirement for growth and health in fish. *J. Appl. Aquacult.*, 9(2):53-79.

LI, M. H.; WISE, D. J.; JOHNSON, M. R.; ROBINSON, E. H. 1994. Dietary menhaden oil reduced resistance of channel catfish (*Ictalurus puctatus*) to *Edwardsiella ictaluri*. *Aquaculture*, 128:335-344.

LI, M. H.; WISE, D. J.; ROBINSON, E. H. 1998. Effect of dietary vitamin C on weight gain, tissue ascorbate concentration, stress response, and disease resistance of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J. World Aquacult. Soc.*, 29(1):1-8.

LI, P.; BURR, G. S.; GOFF, J.; WHITEMAN, K. W.; DAVIS, K. B.; VEGA, R. R.; NEILL, W. H.; GATLIN III, D. M. 2005. A preliminary study on the effects of dietary supplementation of brewers yeast and nucleotides, singularly or in combination, on juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquac. Res.*, 36:1120-1127.

LI, P.; GATLIN III, D. M. 2003. Evaluation of brewer yeast (*Saccharomices cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). *Aquaculture*, 219(1-4):681-692.

LI, P.; GATLIN III, D. M. 2004. Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobiotic™ AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Aquaculture*, 231:445-456.

LI, P.; GATLIN III, D. M. 2005. Evaluation of the prebiotic Grobiotic®-A and brewers yeast as dietary supplements for sub-adult hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) challenged in situ with *Mycobacterium marinum. Aquaculture*, 248:197-205.

LI, P.; GATLIN III, D. M. 2006. Nucleotide nutrition in fish: current knowledge and future applications. *Aquaculture*, 251:141-152.

LI, P.; LEWIS, D. H.; GATLIN III, D. M. 2004. Dietary oligonucleotide from yeast RNA influences immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Fish Shellfish Immunol.*, 16:561-569.

LI, Y.; LOVELL, R. T. 1985. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune response in channel catfish. *J. Nutr*., 115:123-131.

LIM, C.; KLESIUS, P. H. 1997. Response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed iron deficient and replete diets to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture*, 157:83-93.

LIM, C.; KLESIUS P. H. 2003.Influence of dietary levels of magnesium on growth, tissue mineral content, and resistance of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, challenged with *Edwarsiella ictaluri*. *J. World Aquac. Soc.*, 34(1):18-28.

LIM, C.; KLESIUS, P. H.; LI, M. H.; ROBINSON, E. H. 2000. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth hematology, immune response and resistence of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *E. ictaluri* challenge. *Aquaculture*, 185:313-27.

LIM, C.; KLESIUS, P. H.; SHOEMAKER. C. A. 2001. Dietary iron and Fish health. In LIM, C.; WEBSTER, C.D, (Ed.). Nutrition and Fish Health. New York: The Haworth Press Inc., p. 189-196.

LIM, C.; WEBSTER, C. D. 2001. *Nutrition and Fish Health*. Binghamton, New York: The Haworth Press.

LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M.; KLESIUS, P. H. 2005. Nutrition, immune response and disease resistance in fish. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES, 1., 2005, Botucatu. *Anais...* Botucatu: Departamento

de Melhoramento e Nutrição Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

LIN, R.; WHITE, J. H. 2004. The pleiotropic actions of vitamin D. *Bioessays*, 26(1):21-28.

LIN, Y.-H.; LIN, S.-M.; SHIAU, S.-Y. 2008a. Dietary manganese requirements of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquaculture*, 284(1-4):207-210.

LIN, Y. H.; SHIAU, S. Y. 2005. Dietary vitamin E requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, at two lipid levels, and their effects on immune responses. *Aquaculture*, 248:235-244.

LIN, Y.-H.; SHIAU, S.-Y. 2005. Dietary selenium requirements of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture*, 250: 356-363.

LIN, Y.-H.; SHIE, Y.-Y.; SHIAU, S.-Y. 2008b. Dietary copper requirements of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture*, 274:161-165.

LIN, Y. H.; WANG, H.; SHIAU, S. Y. 2009. Dietary nucleotide supplementation enhances growth and immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture*, 15:117-122.

LIU, C.; LIN, Q.; GAO, Y.; Y e L; XING, Y.; XI, T. 2007. Characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs. *Carbohyd. Polym.*, 67:313-318.

LOGATO, P. V. R. 2000. *Nutrição e alimentação de peixes da água doce*. Viçosa, MG: Aprenda fácil editora.

LÓPEZ-NAVARRO, A. T.; GIL, A.; SÁNCHEZ-POZO, A. 1995. Deprivation of dietary nucleotides results in a transient decrease in acid-soluble nucleotides and RNA concentration in rat liver. *J. Nutr.*, 125:2090-2095.

LOVELL, T. 1989. New sources of vitamin C for fish feeds. *Aquatic Magazine,* 15(2):65-66.

LOVELL, R. T. 1988. *Nutrition and feeding of fish*. New York: Van Nostrand Reinhold.

LOVELL, R. T. 1998. *Nutrition and feeding of fish*. 2. ed. Boston: Kluwer Academic Publishers.

LOVELL, R. T. 2000. Dietary requirements for ascorbic acid by warmwater fish. In: DABROWSKI, K. (Ed.). *Ascorbic acid in aquatic organisms: status and perspectives*. Boca Raton: CRC Press, p. 97-104.

LOVELL, R. T.; LI, Y. 1978. Essentiality of vitamin D in diets of channel catfish (*Ictalurus punctatus).Trans. Am. Fish Soc.*, 107: 809-811.

LOW, C.; WADSWORTH, S.; BURRELS, C.; SECOMBES, C. J. 2003. Expression of immune genes in turbot (*Scophthalmus maximus*) fed a nucleotide-supplemented diet. *Aquaculture*, 221:23-40.

LUNDEBYE, A. K.; BERNTSSEN, M. H. G.; WENDELAAR BONGA, S. E.; MAAGE, A. 1999. Biochemical and physiological responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following dietary exposure to copper and cadmium. *Mar. Pollut. Bull.*, 39:137-144.

LUSHCHAK, O. V.; KUBRAK, O. I.; NYKORAK, M. Z.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. 2008. The effect of potassium dichromate on free radical processes in goldfish: Possible protective role of glutathione. *Aquat. Toxicol.*, 87:108-114.

LUSHCHAK, O. V.; KUBRAK, O. I.; TOROUS, I. M.; NAZARCHUK, T. Y.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. 2009. Trivalent chromium induces oxidative stress in goldfish brain. *Chemosphere*, 75:56-62.

LUZZANA, U.; VALFRÉ, F.; LANARI, D. 1995. Protective role of vitamin C against environmental stressors and pathogens in intensive aquaculture. *Riv. Ital. Acquacolt.*, 30:49-64.

MAHAJAN, C. L.; AGRAWAL, N. K. 1980. Nutritional requirement of ascorbic acid by Indian major carp, *Cirrhina mrigala*, during early growth. *Aquaculture*, 19:37-48.

MAITA, M. 2007. Fish health assessment. In: NAKAGAWA, H.; SATO, M.; GATLIN III, D. M. (Ed.). *Dietary supplements for the health and quality of cultured fish*. UK: Cromwell Press, p. 10-34.

MARTINO, R. C.; CYRINO, J. E. P.; PORTZ, L.; TRUGO, L. C. 2002. Effect of dietary lipid level on nutritional performance of the surubim, *Pseudoplatystoma coruscans*. *Aquaculture*, 209:209-218.

MARTINS, M. L. 1995. Effect of ascorbic acid deficiency on the growth, gill filament lesions and behaviour of pacu fry (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). *Braz. J. Med. Biol. Res.,* 28:563- 568.

MARTINS, M. L. 1998. Evaluation of the addition of ascorbic acid to the ration of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) on the infrapopulation of *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31:655-658.

MARTINS, M. L.; CASTAGNOLLI, N.; ZUIM, S. M. F.; URBINATI, E. C. 1995. Influência de diferentes níveis de vitamina C na ração sobre parâmetros hematológicos de alevinos de *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG (OSTEICHTHYES, CHARACIDAE). *Rev. Bras. Zool.*, 12:609-618.

MARTINS, M. L.; MIYAZAKI, D. M. Y.; MORAES, F. R.; GHIRALDELLI, L.; ADAMANTE, W. B.; MOURINO, J. L. P. 2008. Ração suplementada com vitaminas C e E influencia a resposta inflamatória aguda em tilápia do Nilo. *Ciênc. Rural*, 38(1):213-218.

MATHIEU, C.; VAN ETTEN, E.; GYSEMANS, C. 2005. In vitro and in vivo analysis of the immune system of vitamin D receptor knockout mice. *J. Bone Miner. Res.*, 16:2057-2065.

MATUSIEWICZ, M.; DABROWSKI, K. 1995. Characterization of ascorbyl esters hydrolysis in fish. *Comp Biochem Physiol*, B:1-7.

MAZIK, P. M.; BRANDT, T. M.; TOMASSO, J. R. 1987. Effects of dietary vitamin C on growth, caudal fin development and tolerance of aquaculture-related stressors in channel catfish. *Progress. Fish Culture,* 49:13-16.

MAZURAIS, D.; DARIAS, M. J.; GOUILLOU-COUSTANS, M. F.; LE GALL, M. M.; HUELVAN, C.; DESBRUYE`RES, E.; QUAZUGUEL, P.; CAHU, C.; ZAMBONINO-INFANTE, J. L. 2008. Dietary vitamin mix levels influence the ossification process in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 294:520-527.

McCLUSKEY, E. S. 1985. Which vertebrates make vitamin C. *Origins,* 12(2):96-100.

MCDOWELL, L. R. 1989. *Vitamins in animal nutrition*. San Diego: Academic Press.

MCDOWELL, L. R. 1992. *Minerals in animal and humans nutrition*. San Diego: Academic Press.

MENDES, F. A. 2000. *Efeito da vitamina D no ganho de peso e nos níveis de cálcio e fósforo inorgânico de Colossoma macropomum (Characiformes, Serrasalmidae)*. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Fundação Universidade do Amazonas, Manaus.

MENEZES, G. C.; TAVARES-DIAS, M.; ONO, E. A.; ANDRADE, J. I. A.; BRASIL, E. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E. G. 2006. The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. *Comp. Biochem. Physiol.*, 145:274–279.

MESQUITA-SAAD, L. S. B. 2001. O teor de vitamina C em peixes da amazônia: aspectos adaptativos. 119 f. Tese (Doutorado) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Fundação Universidade do Amazonas, Manaus.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R.; SOARES, C. M. 2002. Lipídeos na Alimentação de Alevinos Revertidos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). *R. Bras. Zootec.*, 31(2):566-573.

MEYDANI, S. N.; ENDRES, S.; WOODS, M. M.; GOLDIM, B. R.; SOO, C.; MORRILL-LABRODE, A.; DINARELLO, C. A.; GORBACH, S. L. 1991. Oral (n-3) fatty acids supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *J. Nutr.*, 121:547-555.

MEYDANI, S. N.; HAN, S. N.; WU, D. 2005. Vitamin E and immune response in the aged: molecular mechanisms and clinical implications. *Immunol. Rev.*, 205:269-284.

MILLER, W. L.; PORTALLE, A. A. 1999. Genetic disorders of vitamin D biosynthesis. *Pediatr. Endocrinol*., 28(4):825-840.

MILLS, S. C.; WINDSOR, A. C.; KNITHG, S. C. 2005. The potential interactions between polyunsaturated fatty acids and colonic inflammatory processes. *Clin. Exp. Immunol.*, 142:216-228.

MISRA, C. K.; DAS, B. K.; MUKHERJEE, S. C.; PRADHAN, J. 2007. Effects of dietary vitamin C on immunity, growth and survival of Indian major carp *Labeo rohita*, fingerlings. *Aquacult. Nutrition*, 13:35-44.

MISRA, C. K.; KUMAR, B. D.; MUKHERJEE, S. C.; PATTNAIK, P. 2006. Effect of long term administration of dietary β-glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture*, 255:82–94.

MONTERO, D.; GRASSO, V.; IZQUIERDO, M. S.; REAL, F.; TORT, L.; CABALLERO, M. J.; ACOSTA, F. 2008. Total substitution of fish oil by vegetable oil in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: effects on hepatic Mx expression and some immune parameters. *Fish Shellfish Immunol*, 24:147-155.

MONTERO, D.; KALINOWSKI, T.; OBACH, A.; ROBAINA, L.; TORT, L.; CABALLERO, M. J.; IZQUIERDO, M. S. 2003. Vegetable lipid sources for gilthead sea bream (*Sparus aurata*): effects on fish health. *Aquaculture*, 225:353-370.

MONTERO, D.; MARRERO, M.; IZQUIERDO, M. S.; ROBAINA, L.; VERGARA, J. M.; TORT, L. 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture*, 171:269–278.

MONTERO, D.; ROBAINA, L.; VERGARA, J. M.; IZQUIERDO, S. M. 2001. Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish Shellfish Immunol*., 11:473–490.

MONTERO, D.; TORT, L.; IZQUIERDO, M. S.; ROBAINA, L.; VERGARA, J. M.; 1998. Depletion of serum alternative complement pathway activity in

gilthead seabream caused by a-tocopherol and *n*y3 HUFA dietary deficiencies. *Fish Physiol. Biochem*. 18:399–407.

MONTEIRO, D. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. 2007. Uso do selênio na dieta de matrinxã, *Brycon cephalus*. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, 8(1):32-47.

MOREAU, R.; DABROWSKI, K. 2000. Gulonolactone oxidase presence in fishes: activity and significance. In: DABROWSKI, K. (Ed.). *Ascorbic acid in aquatic organisms*: status and perspectives. Boca Raton: CRC Press, p. 13-32.

MOREIRA, A. B.; VISENTAINER, J. V.; SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M. 2001. Fatty acids profile and cholesterol contents of Three Brazilian Brycon freshwater fishes. *J. Food Compos. Anal.*, 14:565-574.

MOURENTE, G.; GOOD, J. E.; BELL, J. G. 2005. Partial substitution of fish oil with rapessed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effets on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E_2 and $F_{2\alpha}$, immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Aquacult. Nutr.*, 11:25-40.

MUNTZ, W. R. A. 1981. Observações adicionais sobre os pigmentos visuais e filtros amarelos nos olhos de peixes amazônicos. *Acta Amazônica*, 11(1):113-123.

MUSTAFA, T.; SRIVASTAVA, K. C. 1989. Prostaglandins (eicosanoids) and their role in ectothermic organisms. *Adv. Comp. Environ. Physiol.*, 5:157-207.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). 1993. *Nutrient Requirements of Fishes*. Washington, DC: National Academy of Sciences.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). 1993. *Nutrient Requiments of Domestic Animals*: Nutrient Requirements of Warmwater Fishes and Shellfishes. Washington, DC: National Academic Press, 102 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). 2001. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7th. Washington, DC: National Academy Press.

NAVARRE, O.; HALVER, J. E. 1989. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture*, 79:207-221.

NEW, M. B. 1987. *Feed and feeding of fish and shrimp* - a manual on the preparation and presentation of compound feeds for shrimp and fish in aquaculture. Rome: FAO. (Report No. ADCP/REP/87/26).

NIKL, L.; EVELYN, T. P. T.; ALBRIGHT, L. J. 1993. Trials with an orally and immersion-administered beta-1,3 glucan as an immunoprophylatic against *Aeromonas salmonicida* in juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis. Aquat. Organ.*, 17:191-196.

NORMAN, A. W. 2008. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am. J. Clin. Nutr.*, 88(2):491-499.

NUSSEY, G.; VAN VUREN, J. H. J.; PREEZ, H. H. 1995. Effect of copper on the haematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 111C:369-380.

O´CONNELL, J. P.; GATLIN III, D. M. 1994. Effects of dietary calcium and vitamin D(3) on weight gain and mineral composition of the blue tilapia (*Oreochromis aureus*) in low-calcium water. *Aquaculture*, 125:107-117.

O'KEEFE, T. 2001. *Ascorbic acid and stable ascorbate esters as sources of vitamin C in aquaculture feeds*. Singapore: American Soybean Association – United Soybean Board, 8 p. (ASA Technical Bulletin Vol. AQ48-2001). Disponível em: <http://www.asasea.com/technical/aq48-2001.html>. Acesso em: 4 maio 2009.

OGATA, H. Y.; OKU, H. 2001. The effects of dietary retinoic acid on body lipid deposition in juvenile red sea bream (*Pagrus major*): a preliminary study. *Aquaculture*, 193:271-279.

OGINO, C.; CHIOU, J. Y. 1976. Mineral requirements in fish – II. Magnesium requirement of carp. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 42(1):71-75.

OGINO, C.; TAKEDA, H. 1976. Mineral requirements in fish. 3. Calcium and phosphorus requirements of carp. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*., 42:793-799.

OGINO, C.; YANG, G. Y. 1978. Requirement of rainbow trout for dietary zinc. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*., 44:1015-1018.

OGINO, C.; YANG, G. Y. 1979. Requirement of carp for dietary zinc. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 45:967-969.

OGINO, C.; YANG, G. Y. 1980. Requirements of carp and rainbow trout for dietary manganese and copper. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*., 46:455-458.

OKAMURA, D. 2007. *Suplementação do ascorbil palmitato e do alfa-tocoferol no desenvolvimento e estresse em larvas de dourado* (*Salminus brasiliensis*). Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

ORNSRUD, R.; GRAFF, L. E.; HOIE, S. 2002. Hypervitaminosis A in first-feeding fry of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L) . *Aquacult. Nutrition*, 8(1):7-13.

ORTOLANI, E. L. 2002. Macro e microelementos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; BERNARDI, M. M. (Ed.). *Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 641-651.

ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. 2001. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Vet. Immunol. Immunopathol*., 79:167–180.

ORTUÑO, J.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. 2000. High dietary intake of tocopherol acetate enhances the non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 10:293-307.

ORUN, I.; TALAS, Z. S.; OZDEMIR, I.; ALKAN, A.; ERDOGAN, K. 2008. Antioxidative role of selenium on some tissues of (Cd^{2+}, Cr^{3+})-induced rainbow trout. *Ecotox. Environ. Safety*., 71:71-75.

OTANI, F. S. 2009. *Influência da adição in vivo de vitamina E e de métodos de abate nos atributos de qualidade de filés de tilápia.* Dissertação (Mestrado) – Centro de Aqüicultura da Unesp, Jaboticabal.

OWEN, J. M.; ADRON, J. W.; MIDDLETON, C.; COWEY, C. B. 1975. Elongation and desaturation of dietary fatty acids in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Lipids*, 10:528-531.

PABLO, M. A.; PUERTOLLANO, M. A.; CIENTIFUEGOS, G. V. 2002. Biological and clinical significance of lipids as modulators of immune functions. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*., 9:945-950.

PAN, L.; ZHU, X.; XIE, S.; LEI, W.; HAN, D.; YANG, I. 2008. Effects of dietary manganese on growth and tissue manganese concentrations of juvenile gilbel carp, *Carassius auratus gibelio*. *Aquacult. Nutr*., 14:459–463.

PANIGRAHI, A.; KIRON, V.; PUANGKAEW, J.; KOBAYASHI, T.; SATOH S.; SUGITA, H. 2005. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 243:241-254.

PARENT, G.; ROUSSEAUX-PREVOST, R.; CARLIER, Y.; CAPRON, A. 1984. Influence of vitamin A on the immune response of Schistosoma mansoni-infected rats. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*., 78:380-384.

PARIPATANANONT, T.; LOVELL R. T. 1995. Responses of Channel Catfish Fed Organic and Inorganic Sources of Zinc to *Edwardsiella ictaluri*. *J. Aquat. Anim. Health*, 7(2):147-154.

PARIZA, M. W.; PARK, Y.; COOK, M. E. 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog. Lipid. Res.*, 40:283-298.

PARKER, R. B. 1974. Probiotics. The other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health*. 29:4-8.

PASATIEMPO, A. M.; KINOSHITA, M.; TAYLOR, C. E.; ROSS, A. C. 1990. Antibody production in vitamin A-depleted rats is impaired after immunization with bacterial polisaccharide or protein antigens. *FASEB J*., 4:2518-2527.

PAUL, B. N.; SARKAR, S.; GIRI, S. S.; RANGACHARYULU, P. V.; MOHANTY, S. N. 2004. Phosphorus requirements and optimum calcium/phosphorus ratio in the diet of mrigal *Cirrhinus mrigala* (Ham.) fingerlings. *J. Appl. Ichthyol.*, 20:206-209.

PAULSEN, S. M.; ENGSTAD, R. E.; ROBERTSEN, B. 2001. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast β-glucan and bacterial lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.*, 11:23-37.

PEIL, S. Q.; POUEY, J. L. O. F.; LOPES, P. R. S.; MARTINS, C. R.; TIMM, G. 2007. Adição de vitamina A na dieta de pós-larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). *Biodivers. Pampeana*, 5(1):9-15.

PEZZATO, L. P.; BARROS, M. M.; FRACALOSSI, D. M.; CYRINO, J. E. P. 2004. Nutrição de peixes. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva.* São Paulo: TecArt, p. 75-169.

PEZZATO, L. E.; ROSA, M. J. S.; BARROS, M. M.; GUIMARÃES, I. G. 2006. Exigência em fósforo disponível para alevinos de tilápia do Nilo. *Ciênc. Rural*, 36(5):1600-1605.

PIEDRAS, S. R. N.; MORAE, P. R. R.; ISOLDI, L. A.; POUEY, J. L. O. F.; RUTZ, F. 2005. Comparação entre o selênio orgânico e o inorgânico empregados na dieta de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). *B. Inst. Pesca*, 31(2):171-174.

PILARSKI, F. 2006. *Imunização de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) com antígeno obtido de Flavobacterium columnare e suplementação alimentar com vitamina C*. 118 f. Tese (Doutorado) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista.

PILARSKI, F.; CHAGAS, E. C.; VARANDAS, D. N.; SAKABE, R. 2009. Effect of β-glucan supplementation in the juvenile *Oreochromis niloticus* vaccinated against Flavobacterium columnare: non-specific immune parameters. In: WORLD AQUACULTURE, 2009, Veracruz. *Anais...* Veracruz: WORLD AQUACULTURE SOCIETY.

PROSSER, D. E.; JONES, G. 2004. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem. Sci.*, 29:664-673.

PRYOR, G. S.; ROYES, J. B.; CHAPMAN, F. A.; MILES, R. D. 2003. Mannanoligosaccharides in fish nutrition: effects of dietary supplementation on growth and gastrointestinal villi structure in Gulf of Mexico sturgeon. *North Amer. J. Aquacul.*, 65:106-111.

PUANGKAEW, J.; KIRON, V.; SOMAMOTO, T.; OKAMOTO, N.; SATOH, S.; TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. 2004. Non-specific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. *Fish Shellfish Immunol*., 16:25–39.

RAA, J. 1996. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Rev. Fish Biol. Fisher.*, 4:229-288.

RAMADAN, A.; ATEF, M. 1991. Effect of the biogenic performance enhancer (Ascogen “S”) on growth rate of tilapia fish. *Acta Vet. Scand.*, 87:304-306.

RAMIREZ, R. F.; DIXON, B. A. 2003. Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from oscars (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture*, 227:417-426.

RAO, D. S.; RAGHURAMULU, N. 1999. Is vitamin D redundant in an aquatic habitat? *J. Nutr. Sci. Vitaminol*., 45:1-8.

REN, T.; KOSHIO, S.; TESHIMA, S. I.; ISHIKAWA, M.; ALAM, S.; PANGANIBAN JUNIOR, A.; MOE, Y. Y.; KOJIMA, T.; TOKUMITSU, H. 2005. Oprimum dietary level of L-ascorbic for Japanese Eel, *Anguilla japonica*. *J. World. Aquacult. Soc.*, 36(4):437-443.

RENO, F.; AINA, V.; GATTI, S.; CANNAS, M. 2005. Effect of vitamin E addition to poly(D,L)-lactic acid on surface properties and osteoblast behaviour. *Biomaterials*, 26:5594–5599.

RIBEIRO, F. B.; LANNA, E. A. T.; BOMFIM, M. A. D.; DONZELE, J. L.; FREITAS, A. S.; SOUSA, M. P.; QUADROS, M. 2006. Níveis de fósforo total em dietas para alevinos de tilápia-do-nilo. *R. Bras. Zootec.*, 35(4):1588-1593.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. 1986. *Patologia estrutural e funcional*. 3. ed. [S.l.]: Interamericana.

ROBERTS, M. L.; DAVIES, S. J.; PULSFORD, A. L. 1995. The influence of ascorbic acid (vitamin C) on non-specific immunity in the turbot *(Scophthalmus maximus L.) Fish Shellfish Immunol*., 5:27-38.

ROBERTSEN, B.; ENGSTAD, R. E.; JORGENSEN, J. B. 1994. β-glucans as immunostimulators in fish. In: STOLEN, J. S.; FLETCHER, T. (Ed.). *Modulators of Fish Immune Responses*. Fair Haven, VT: SOS Publications, p. 83-99.

ROBERTSEN, B.; RORSTAD, G.; ENGSTAD, R.; RAA, J. 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J. Fish Dis.*, 13:391-400.

ROBINSON, E. H.; RAWLES, S. D.; BROWN, P. B.; YETTE, H. E.; GREENE, L. W. 1986. Dietary calcium requirement of channel catfish (*Ictalurus punctatus*), reared in calcium-free water. *Aquaculture*, 53:263-270.

RODESHUTSCORD, M. 1996. Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growing from 50 to 200 g to supplements of dibasic sodium phosphate in a semipurified diet. *J. Nutr.*, 126:324-331.

ROESIJADI, C.; ROBINSON, W. 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. In: MALINS, D. C.; OSTRANDER, G. K. (Ed.). *Aquatic toxicology, molecular, biochemical and cellular perspectives*. Boca Raton: CRC Press, p. 387–420.

ROTTA, M. A. 2003. *Utilização do ácido ascórbico (Vitamina C) pelos peixes*. Corumbá: Embrapa Pantanal, 54 p. (Embrapa Pantanal. Documentos, 49).

ROY, P. K.; LALL, S. P. 2003. Dietary phosphorus requirement of juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). *Aquaculture*, 221:451-468.

SÁ, M. V. C.; PEZZATO, L. E.; LIMA, M. M. B. F.; PADILHA, P. M. 2004. Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles diets. *Aquaculture*, 238:385–401.

SAARI, J. C. 1994. Retinoids in photosensitive system. 2. ed. New York: Raven Press.

SADO, R. Y. 2008. *Imunoestimulantes dietéticos e respostas biológicas, bioquímicas e hematológicas de juvenis de Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887).* 136 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SAHOO, P. K.; MUKHERJEE, S. C. 2002. Influence of fish dietary α-tocopherol intakes on specific immune response, non-specific immune resistance factors and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquac. Nutr.*, 8:159–167.

SAKABE, R. 2007. *Suplementação alimentar com ácidos graxos essenciais para tilápia do Nilo: desempenho produtivo, hematológico e granuloma por corpo estranho*. Dissertação (Mestrado) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SAKAI, M. 1999. Current research status of immunostimulants. *Aquaculture*, 172:63-92.

SAKAI, M.; TANIGUCHI, K.; MAMOTO, K.; OGAWA, H.; TABATA, M. 2001. Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio L*. *J. Fish Dis.*, 24:433-438.

SALVADOR, R. 2008. *Imunização e inflamação por Streptococcus agalactiae em tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) alimentadas com ração suplementada com parede celular de Saccharomyces cerevisiae.* Tese (Doutorado) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SALZE, G.; McLEAN, E.; SCHWARZ, M. H.; CRAIG, S. R. 2008. Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia. *Aquaculture*, 274:148-152.

SANTARÉM, M.; NOVOA, B.; FIGUERAS, A. 1997. Effects of β-glucans on the non-specific immune responses of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 7:429-437.

SANTOS, L. D.; FURUYA, W. M.; MATSUSHITA, M.; SILVA, L. C. R.; SILVA, T. S. C.; BOTARO, D. 2007. Ácido linoléico conjugado (CLA) em dietas para tilápia-do-nilo: desempenho produtivo, composição química e perfil de ácidos graxos. *R. Bras. Zootec.*, 36(5):1481-1488.

SARGENT, J. R.; BELL, J. G.; BELL, M. V.; HENDERSON, R. J.; TOCHER, D. R. 1995. Requirement criteria for essential fatty acids. *J. Appl. Icthyol.*, 11:183-198.

SARGENT, J. R.; HENDERSON, R. J.; TOCHER, D. R. 1989. The lipids. In: HALVER, J. E. (Ed.). *Fish Nutrition*. New York: Academic Press, p. 154-218.

SARGENT, J. R.; TOCHER, D. R.; BELL, J. G. 2002. The lipids. In: HALVER, J. E.; HARDY, R. (Ed.). *Fish Nutrition*. 3. ed. [S.l.]: Elsevier, p. 181-257.

SARKER, P. K.; FUKADA, H.; MASUMOTO, T. 2009. Phosphorus availability from inorganic phosphorus sources in yellowtail (*Seriola quinqueradiata* Temminck and Schlegel). *Aquaculture*, 289:113-117.

SARMA, K.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; AYYAPPAN, S.; BARUAH, K. 2009. Dietary high protein and vitamin C mitigates endosulfan toxicity in the spotted murrel, *Channa punctatus* (Bloch, 1793). *Scien. Total Environ.*, 407:3668-3673.

SATOH, S.; POE, W. E.; WILSON, R. P. 1989a. Effect of dietary n-3 fatty acids on weight gain and liver polar lipid fatty acid composition of fingerling channel catfish. *J. Nutr.*, 119:23-28.

SATOH, S.; POE, W. E.; WILSON, R. P. 1989b. Studies on the essential fatty acid requirement of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 79:121-128.

SATOH, S.; TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. 1987. Requirement of tilapia for α-tocopherol. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53:119-124.

SCARPA, J.; LEWIS, D. H.; GATLIN III, D. M. 1992. Effects of dietary zinc and calcium on select immune functions of channel catfish. *J. Aquat. Anim. Health,* 4:24-31.

SCHNEIDER, C. 2005. Chemistry and biology of vitamin E. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49:7-30.

SCHORER, M. 2008. *Utilização do β-glucano sobre o desempenho produtivo, indicadores de estresse, perfil hematológico e sobrevivência do pacu (Piaractus mesopotamicus).* Dissertação (Mestrado) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SEALEY, W. M.; BARROWS, F. T.; HANG, A.; JOHANSEN, K. A.; OVERTURF, K.; LAPATRA, S. E.; HARDY, R. W. 2008. Evaluation of the ability of barley genotypes containing different amounts of β-glucan to alter growth and disease resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Animal Feed Science and Technology*, 141:115-28.

SEALEY, W. M.; GATLIN III, D. M. 2002. Dietary supplementation of vitamin C and/or vitamin E before or after experimental infection with *Streptococcus iniae* has limited effects on survival of hybrid striped bass. *J. Aq. Anim. Health*, 14:165-175.

SECOMBES, C. J. 1985. The *in vitro* formulation of teleost multinucleate gigant cells. *J. Fish Dis.*, 8:461-464.

SECOMBES, C. J.; CLEMENTS, K.; ASHTON, I.; ROWLEY, A. F. 1994. The effect of eicosanoids on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, leucocyte proliferation. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 42:367-378.

SECOMBES, C. J.; FLECHER, T. C. 1992. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annu. Rev. Fish Dis.,* 2:53-71.

SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. 2005. Use of glucan from *Saccharomyces cerevisiae* as an immunostimulant in carp: impact on hematology, phagocyte function and infection with *Aeromonas hydrophila. Israeli J. Aquacult.*, 57(1):39-48.

SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. 2006. Adjuvant and immunostimulatory effects of β-glucan administration in combination with

lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 114:15-24.

SGARBIERI, V. C. 1987. *Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento*. Campinas: Editora da UNICAMP.

SHAO, Q.; MA, J.; XU, Z.; HU, W.; XU, J.; XIE, S. 2008. Dietary phosphorus requirement of juvenile black seabream, *Sparus macrocephalus*. *Aquaculture*, 277:92-100.

SHEARER, K. D.; ASGARD, T. 1992. The effect of water-borne magnesium on the dietary magnesium requirement of the rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*). *Fish. Phisiol. Biochem.*, 9(5-6):387-392.

SHELDON JUNIOR, W. M.; BLAZER, V. S. 1991. Influence of dietary lipid and temperature on bactericidal activity of channel catfish macrophage. *J. Aquat. Anim. Health*, 3:87-93.

SHERWOOD, E. R.; WILLIAMS, D. L.; McNAME, R. B.; JONES, E. L.; BROWDER, I. W.; DI LUZIO, N. R. 1987. Enhancement of interleukin-1 and interleukin-2 production by soluble glucan. *Int. J. Immunopharm.*, 9:261-267.

SHIAU, S. Y.; CHEN, M. J. 1993. Carbohydrate utilization by Tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) as Influenced by Different Chromium Sources. *J. Nutr.*, 123:1747.

SHIAU, S. Y.; HSU, C. Y. 2002. Vitamin E sparing effect by dietary vitamin C in juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Aquaculture*, 210:335-342.

SHIAU, S. Y.; HSU, T. S. 1993. Stability of ascorbic acid in shrimp feed during the analysis. *Nip. Suis. Gakkaishi*, 59:1535-1537.

SHIAU, S. Y.; HUANG, S. Y. 1993. Dietary folic requeriment for maximal growth of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Fish. Scien.*, 67:655-659.

SHIAU, S. Y.; JAN, F. L. 1992. Dietary ascorbic acid requirement of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 58:671-675.

SHIAU, S. Y.; NING, Y. C. 2003. Estimating of dietary copper requirements for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus×O. aureus*. *Anim. Sci.*, 77:287–292.

SHIAU, S. Y.; SHIAU, L. F. 2001. Reevaluation of the vitamin E requeriments of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105:147-150.

SHIAU S. Y.; SU, L. W. 2003. Ferric citrate is half as effective as sulfate in meeting the iron requirement of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus×O. aureus*. *J. Nutr.*, 133:483-488.

SHIAU, S.-Y.; TSENG, H.-C. 2007. Dietary calcium requirements of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, reared in fresh water. *Aquacult. Nutr.*, 13:298-303.

SHIM, K. F.; TAN, C. H. 1990. The dietary requirement of vitamin A in guppy (Poecilla reticulata Peters). In: TAKEDA, M.; WATANABE, T. (Ed.). *Proceedings of the Third International Symposium on Feeding and Nutrition in Fish*: the Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture. Toba, Japan, p.133-140.

SHIMMA, Y.; SUZUKI, R.; YAMAGUCHI, M.; AKIYAMA, T. 1977. On the lipids of adult carps raised on fishmeal and SCP feeds, and hatchabilities of their eggs. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.*, 27:35-48.

SIGNOR, A. 2007. *Desempenho produtivo e resistência ao estresse pelo frio da tilápia do Nilo alimentada com dietas suplementadas com levedura autolisada e zinco*. Dissertação (Mestrado) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SILVA DA, L. P.; NÖRNBERG, J. L. 2003. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. *Ciênc. Rural*, 33:983-990.

SIWICKI, A. K.; ANDERSON, D. P.; RUMSEY, G. L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet. Immunol. Immunopath.*, 41:125-139.

SIWICKI, A. K.; ZAKES, Z.; TERECH-MAJEWSKA, E.; KOWALSKA, A.; MALACZEWSKA, J. 2009. Supplementing the feed of pikeperch [*Sander lucioperca* (L.)] juveniles with MacroGard and its influence on nonspecific cellular and humoral defense mechanisms. *Aquacult. Res.*, 40:405-411.

SMITH, E. L.; HILL, R. L.; LEHMAN, I. R. 1983. *Principles of biochemistry: mammalian biochemistry*. 7. ed. New York: McGraw-Hill.

SMITH, V. J.; BROWN, J. H.; HAUTON, C. 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?. *Fish Shellfish Immun.*, 15:71-90.

SOLIMAN, A. K.; JAUNCEY, K.; ROBERTS, R. J. 1994. Water-soluble vitamin requirements of tilapia: ascorbic acid (vitamin C) requirement of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquacult. Fish. Manage.*, 25:269-278.

SORUM, H. 2006. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In: AARESTRUP, F. M. (Ed.). *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. Washigton DC: ASM Press, p. 213-238.

SOUZA, S. M. G.; ANIDO, R. J. V.; TOGNON, F. C. 2007. Ácidos graxos Ômega-3 e Ômega-6 na nutrição de peixes – fontes e relações. *Rev. de Ciências Agrov.*, 6(1):63-71.

SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, A.; NEWMAN, K. E. 2000. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-chalenged broiler chicks. *Poultry Science*, 79:205-211.

STANKOVA, J.; ROLA-PLESZCZYNSKI, M. 1993. Eicosanoids in defence. In: SIM, E. (Ed.). *Humoral Factor*. Oxford: IRL Press, p. 319-335.

STAYKOV, Y.; SPRING, P.; DENEV, S.; SWEETMAN, J. 2007. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult. Int.*, 152:153-161.

STOREBAKKEN, T.; GOSWAMI, U. C. 1996. Plasma carotenoid concentration indicates the availability of dietary astaxanthin for Atlantic salmon, *Salmon salar. Aquaculture*, 146:147-153.

SUGIURA, S. H.; GABAUDAN, J.; DONG, F. M.; HARDY, R. W. 2001. Dietary microbial phytase supplementation and the utilization of phosphorus, trace minerals and protein by rainbow trout [*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)] fed soybean meal-based diets. *Aquacult. Res.*, 32:583-592.

SUZUKI, T.; OOHARA, I.; KUROKAWA, T. 1999. Retinoic acid given at late embryonic stage depresses sonic hedgehog and Hoxd-4 expression in the pharyngeal area and induces skeletal malformation in flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. *Dev. Growth Differ.*, 41:143-152.

TACHIBANA, K.; YAGI, M.; HARA, K.; MISHIMA, T.; TSUCHIMOTO, M. 1997. Effects of feeding b-carotene supplemented rotifers on survival and lymphocyte proliferation reaction of fish larvae of Japanese parrotfish (*Oplegnathus fasciatus*) and spotted parrotfish (*Oplegnathus puncatus*): preliminary trials. *Hydrobiologia*, 358:313-316.

TACON, A. G. J. 1990. *Standard methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp*. Washington DC: Argent Laboratories Press.

TACON, A. G. 1991. Vitamin nutrition in shrimp and fish. In: AQUACULTURE FEED PROCESSING AND NUTRITION WORKSHOP, 1991, Thailand and Indonesia. *Proceedings...* Singapore: Americam Soybean Association.

TACON, A. G. 1992. *Nutritional Fish Pathology*. Rome, Italy: United Nations Development Programme: FAO.

TAKEUCHI, T. 1997. Essential fatty acid requirements of aquatic animals with emphasis in fish larvae and fingerlings. *Rev. Fish*. Sci., 5(1): 1-25.

TAKEUCHI, T.; ARAI, S.; WATANABE, T.; SHIMMA, Y. 1980. Requirement of eel *Anguilla japonica* for essential fatty acids. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 46:345-353.

TAKEUCHI, T.; SATOH, S.; WATANABE, T. 1983. Requirement of Tilapia nilotica for essential fatty acids. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*., 49:1127-1134.

TAKEUCHI, T.; TOYOTA, M.; SATOH, S.; WATANABE, T. 1990. Requirement of juvenile red sea bream *Pagrus major* for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Nipp. Suis. Gak*., 56:1263-1269.

TAKEUCHI, T.; WATANABE, K.; YONG, W.-Y.; WATANABE, T. 1991. Essential fatty acids of grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Nipp. Suis. Gak*., 57:467-473.

TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. 1977a. Requirement of carp for essential fatty acids. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*., 43:541-551.

TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. 1977b. Dietary levels of methyl laurate and essential fatty acid requirement of rainbow trout. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*., 43: 893-898.

TAOKA, Y.; MAEDA, H.; JO, J. Y.; JEON, M. J.; BAI, S. C.; LEE, W. J.; YUGE, K.; KOSHIO, S. 2006. Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fish. Sci.*, 72:310-321.

TAVEEKIJARAN, P.; MIYAZAKI, T.; MATSUMOTO, M. 1994. Vitamin A deficiency in cherry salmon. *J. Aquat. Anim. Health*, 6:251-259.

TESKEREDZIC, Z.; TESKEREDZIC, E.; HACMANJEK, M. 1989. High mortality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fry caused by deficiency of vitamins C and B2 in commercial fish farms in Yugoslavia. *Aquaculture*, 79:245-248.

TEWARY, A.; PATRA, B. C. 2008. Use of vitamin C as an immunostimulant. Effect on growth, nutritional quality, and immune response of *Labeo rohita* (Ham.). *Fish Physiol. Biochem*., 34:251-259.

THAKUR, M. L.; SRIVASTAVA, U. S. 1996. Vitamin-E metabolism and its application. *Nutr. Res.*, 16(10):1767-1809.

THOMPSON, I.; CHOUBER, C.; HOULIHAN, D. F. 1995. The effect of dietary vitamin A and astaxanthin on the immunocompetence of rainbow trout. *Aquaculture*, 133: 91-102.

THOMPSON, I.; WHITE, A.; FLETCHER, T. C.; HOULIHAN, D. F.; SECOMBES, C. J. 1993. The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon

(*Salmo salar*) fed diets containing different amounts of vitamin C. *Aquaculture*, 114(1-2):1-18.

THOMPSON, K. D.; TATNER, M. F.; HENDERSON, R. J. 1996. Effects of dietary (n-3) and (n-6) polynsaturated fattty acid ratio on the immune response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquacult. Nutr.,* 2:21-31.

TOCHER, D. R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fisheries Sci.*, 11:107-184.

TOCHER, D. R.; BENDIKSEN E. A.; CAMPBELL, P. J.; BELL, J. G. 2008. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*, 280:21-34.

TOCHER, D. R.; FONSECA-MADRIGAL, J.; BELL, J. G.; DICK, J. R.; HENDERSON, R. J.; SARGENT, J. R. 2002. Effects of dietary vitamin E on antioxidant defense mechanism of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquacult. Nutr*., 8:195.

TORRECILLAS, S.; MAKOL, A.; CABALLERO, M. J.; MONTERO, D.; ROBAINA, L.; REAL, F.; SWEETMAN, J.; TORT, L.; IZQUIERDO, M. S. 2007. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish Shellfish Immunol.*, 23:969-981.

TOUHATA, K.; TOYOHARA, H.; MITANI, T.; KINOSHITA, M.; SATOU, M.; SAKAGUCHI, M. 1995. Distribution of L-gulono-1,4-lactone oxidase among fishes. *Fish. Scien.*, 61(4):729-730.

TOYAMA, G. N.; CORRENTE, J. E.; CYRINO, J. E. P. 2000. Suplementação de vitamina C em rações para reversão sexual da tilápia do Nilo. *Sci. Agric.*, 57(2):221-228.

TRECHSEL, U.; EVEQUOZ, V.; FLEISCH, H. 1985. Stimulation of interleukin 1 and 3 prodiction by retinoic acid in vitro. *Bioch. J.*, 230:339-344.

TRONCO, A. P.; RADINÜZ NETO, J.; MEDEIROS, T. S.; LIMA, R. L. 2007. Alimentação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) com dietas semipurificadas e fontes lipídicas. *B. Inst. Pesca*, 33(1):9-17.

TRUST, T. J.; BULL, L. M.; CURRIE, B. R.; BUCKLEY, J. T. 1979. Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), goldfish (*Carassius auratus*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish Res. Bd. Can.*, 36:1174-1179.

TUCKER, B. W.; HALVER, J. E. 1984. Ascorbate-2-sulfate metabolism in fish. *Nutr Rev*, 42:173-179.

UHING, R. J.; COWLEN, M. S.; ADAMS, D. O. 1990. Mechanisms regulating the production of arachidonate metabolites in mononuclear phagocytes. *Curr. Top. Membr. Transp.*, 35:349-374.

VAINIKKA, A.; JOKINEN, E. I.; KORTET, R.; PAUKKU, S.; PIRHONEN, J.; RANTALA, M. J.; TASKINEN, J. 2005. Effects of testosterone and β-glucan on immune functions in tench. *J. Fish Biol.*, 66:348-361.

VARANDAS, D. N. 2009. *Suplementação com vitamina C e cromo para pacu Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887) mantidos em alta densidade de estocagem: Desempenho produtivo, parâmetros hematológicos e desafio com Aeromonas hydrophila*. Tese (Doutorado) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

VERAKUNPIRIYA, V.; WATANABE, K.; MUSHIAKE, K.; KAWANO, K.; KOBAYASHI, T.; HASEGAWA, I.; KIRON, V.; SATOH, S.; WATANABE, T.

1997. Effect of krill meal supplementation in soft-dry pellets on spawning and quality of egg of yellowtail. *Fisheries Sci.*, 63:433-439.

VERLHAC, V.; OBACH, A.; GABAUDAN, J.; SCHUEP, W.; HOLE, R. 1998. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immun.*, 8:409-424.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64:655-671.

VIELMA, J.; LALL, S. P. 1998. Phosphorus utilization by Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in freshwater is not influenced by higher dietary calcium intake. *Aquaculture*, 160:117-128.

VILLENEUVE, L. A. N.; GISBERT, E.; DELLIOU, H. L.; CAHU, C. L.; INFANTE, J. L. Z. 2005. Dietary levels of all-trans retinol affect retinoid nuclear receptor expression and skeletal development in European sea bass larvae. *Br. J. Nutr.*, 93:791-801.

VILLENEUVE, L. A. N.; GISBERT, E.; MORICEAU, J.; CAHU, C. L.; INFANTE, J. L. Z. 2006. Intake of high levels of vitamin A and polyunsaturated fatty acids during different developmental periods modifies the expression of morphogenesis genes in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Br. J. Nutr.*, 95:677-687.

VISENTAINER , J. V.; SOUZA, N. E.; MAKOTO, M.; HAYASHI, C.; FRANCO, M. R. B. 2005. Influence of diets enriched with flaxseed oil on the a-linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acid in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food Chem*., 90:557-560.

WAAGBO, R. 1994. The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a review. *Aquat. Fish Man.*, 25:175-197.

WAHLI, T.; VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.; SCHUEP, W.; MEIER, W. 1998. Influence of combined vitamins A and E on non-specific immunity disease resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis*., 12:127–137.

WAHLI, T.; VERLHAC, V.; GIRLING, P.; GABAUDAN, J.; AEBISCHER, C. 2003. Influence of dietary vitamin C on the wound healing process in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 225:371-386.

WANG, C.; LOVELL, T. 1997. Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast have higher bioavailability than inorganic selenium source, sodium selenite, in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 152:223-234.

WANG, C.; LOVELL, R. T.; KLESIUS, P. H. 1997. Response to *Edwardsiella ictaluri* Challenge by Channel Catfish Fed Organic and Inorganic Sources of Selenium. *J. Aquat. Anim. Health*., 9(3):172-179.

WANG, J.-T.; LIU, Y.-J.; TIAN, L.-X.; MAI, K.-S.; DU, Z.-Y.; WANG, Y.; YANG, H.-J. 2005. Effect of dietary lipid level on growth performance, lipid deposition, hepatic lipogenesis in juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 249:439-447.

WANG, Y.; HAN, J.; LI, W.; XU, Z. 2007. Effect of different selenium source on growth performances, glutathione peroxidase activities, muscle composition and selenium concentration of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Anim. Feed Sci. Technol.*, 134:243–251.

WATANABE, T.; KIRON, V.; DATOH, S. 1997. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture*, 151:185-207.

WATANABE, T.; OGINO, C.; KOSHIISHI, Y.; MATSUNAGA, T. 1974. Requirement of rainbow trout for essential fatty acids. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*., 40:493-499.

WATANABE, T.; TAKEUCHI, T.; MATSUI, M.; OGINO, C.; KAWABATA, T. 1977. Effects of a-tocopherol deficiency on carp: VII. The relationship between dietary levels of linoleate and a-tocopherol requirement. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*., 43:935-946.

WATANABE, T.; TAKEUCHI, T.; OGINO, C. 1975. Effect of dietary methyl linoleate and linolenate on growth of carp-2*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*., 41:263-269.

WATANABE, T.; TAKEUCHI, T.; WADA, M.; VEHARA, R. 1981. The relationship between dietary lipid levels and α-tocopherol requirement of rainbow trout. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*., 47:1463-1471.

WEBSTER, C. D. 2007. Minerals and fish health. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES, 2., 2007, Botucatu. *Anais*...Botucatu: Unesp, 2007. p. 21-34.

WEBSTER, C. D.; LOVELL, R. T.; CLAWSON, J. A. 1994. Ratio of 20:3(n-9) to 20:5(n-3) in phospholipids as an indicator of dietary essential fatty acid sufficiency in striped bass, *Morone saxatilis*, and Palmetto bass, *Morone saxatilis x Morone chryops*. *J. Appl. Aquacult*., 4(4):75-90.

WEDEMEYER, G. A. 1997. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Ed.). *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 35-72.

WELKER, T. L.; LIM, C.; YILDRIM-AKSOY, M.; SHELBY, R.; KLESIUS, P. H. 2007. Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri* challenge in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole-cell or yeast subcomponents. *J. World Aquac. Soc.*, 38:24-35.

WENDELAAR BONGA, S. E. 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77(3):591-625.

WHALEN, K. S.; BROWN, J. A.; PARRISH, C. C.; LALL, S. P.; GODDARD, J. S. 1999. Frequency of feeding in juvenile yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*): Possible regimes for grow-out. *Bull. Aquacult. Assoc. Can*, 98(2):25–26.

WHIGHAM, L. D.; COOK, M. E.; ATKINSON, R. L. 2000. Conjugated linoleic acid: implications for human health. *Pharmacol. Res*., 42(6):503-510.

WHITTINGTON, R.; LIM, C.; KLESIUS, P. H. 2005. Effect of dietary β-glucan levels on the growth response and efficacy of Streptococcus iniae vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 248:217-25.

WILSON, R. P.; BOWSERAZAND, P.; POE, W. E. 1984. Dietary Vitamin E Requirement of Fingerling Channel Catfish. *J. Nutr*., 114:2053-2058.

WILSON, R. P.; GATLIN III, D. M. 1986. Dietary copper requirement of fingerling channel catfish. *Aquaculture*, 4:277–285.

WOODWARD, B. 1994. Dietary vitamin requeriments of cultured young fish, with emphasis on quantitative estimates for salmonids. *Aquaculture*, 124:133-168.

YAMAMOTO, S.; WANG, M. F.; ADJEI, A. A.; AMEHO, C. K. 1997. Role of nucleosides and nucleotides in the immune system, gut reparation after injury, and brain function. *Nutrition*, 13:372-374.

YANBO, W.; ZIRONG, X. 2006. Effect of probiotcs for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Animal Feed Sci. Techn.*, 127:283-292.

YAQOOB, P.; CALDER, P. C. 1995. The effects of dietary lipid manipulation on the production of murine T-cell derived cytokines. *Cytokine*, 7:548-557.

YAQOOB, P.; NEWSHOLME, E. A.; CALDER, P. C. 1994. Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipids. *Immunol. Lett.*, 41:241-247.

YASMIN, A.; TAKEUCHI, T. 2002. Influence of dietary levels of conjugated linoleic acid (CLA) on juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish. Sci.*, 68:991-992.

YE, C.-X.; LIU, Y.-J.; TIAN, L.-X.; MAI, K.-S.; DU, Z.-Y.; YANG, H.-J.; NIU, J. 2006. Effect of dietary calcium and phosphorus on growth, feed efficiency, mineral content and body composition of juvenile grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture*, 255:263-271.

YE, C.-X.; TIAN, L.-X.; YANG, H.-J.; LIANG, J.-J.; NIU, J.; LIU, Y.-J. 2008. Growth performance and tissue mineral content of juvenile grouper (*Epinephelus coioides*) fed diets supplemented with various levels of manganese. *Aquacult. Nutr.*, doi: 10.1111/j.1365-2095.2008.00628.x.

YILDIRIM-AKSOY, M.; LIM, C.; DAVIS, D. A.; SHELBY, R.; KLESIUS, P. H. 2007. Influence of dietary lipid sources on the growth perfomance, immune response and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae* challenge. *J. Appl. Aquacult.*, 19:29-49.

YOO, G.; LEE, S.; KIM, Y. C.; OKORIE, O. E.; PARK, G. J.; HAN, Y. O.; CHOI, S. M.; KANG, J. C.; SUN, M.; BAI, S. 2007. Effects of dietary β-1,3 glucan and feed stimulants in juvenile Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. World Aquacult. Soc.*, 38:138-145.

YU, T. C.; SINNHUBER, R. O. 1979. Effect of dietary n-3 and n-6 fatty acids on growth and feed conversion efficiency of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 16:31-38.

ZHAO, Z.; ROSS, C. 1995. Retinoic acid repletion restores the number of leukocytes and their subsets and stimulates natural cytotoxicity in vitamin A deficieny rats. *J Nutr*., 125:2064-2073.

ZHONG, Y.; LALL, S. P.; SHAHIDI, F. 2007. Effects of oxidized dietary oil and vitamin E supplementation on lipid profile and oxidation of muscle and liver of juvenile atlantic cod (*Gadus morhua*). *J. Agric. Food Chem*., 55:6379-6386.

ZIBDEH, M.; MATSUI, S.; FURUICHI, M. 2001. Requirements of tiger pufferfish *Takifugu rubripes* for dietary iron. *J. Fac. Agr.*, U45:473-479.

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 8

Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável

Eliane Tie Oba, Wagner dos Santos Mariano & Laila Romagueira Bichara dos Santos

Resumo

Alimentação balanceada e fatores ambientais, dentro de níveis ideais, são alguns requisitos básicos necessários para se conseguir a lucratividade desejada dentro da piscicultura. Entretanto, o ambiente em que os peixes são mantidos durante o cultivo pode proporcionar uma grande variedade de agentes estressores, tanto de natureza química, quanto de natureza física. Entre os diversos agentes estressores presentes num sistema de cultivo intensivo a qualidade da água (concentração de O_2 dissolvido, de amônia e de nitrito, presença de poluentes orgânicos e inorgânicos), a manipulação (captura ou transporte), a alimentação e as interações biológicas (alta densidade populacional, confinamento) são os mais importantes. De forma geral, a resposta ao estresse apresenta três níveis: as respostas primárias pela ativação dos centros cerebrais resultam na liberação de catecolaminas e de corticosteroides; as respostas secundárias incluem aumentos do débito cardíaco, da capacidade de transporte de O_2, da mobilização de substratos energéticos e dos distúrbios no balanço hidromineral; e as respostas terciárias se estendem para o nível de organismo e populacional, apresentando efeitos como inibição do crescimento, da reprodução e da resposta imune, além da redução da capacidade de tolerância a agentes estressores adicionais. Assim, o entendimento básico da fisiologia do estresse e das alterações ambientais durante o cultivo, possibilita a identificação das condições adversas e o desenvolvimento de métodos que mitiguem os seus efeitos na saúde dos peixes cultivados.

Abstract

Balanced nutrition and environmental factors, within optimal levels, are some basic requirements to achieve desired profitability in fish. However, the environment where fish were maintained can provide a variety of stressors, from chemical and physical nature. In intensive cultivation system the water quality (dissolved O_2 concentration, ammonia and nitrite, inorganic and organic pollutants presence), handling (capture or transport), food and biological interactions (high stock density, confinement) are the most important stressors. In general, the stress response has three levels: primary responses are activation of brain centers, resulting in a massive release of catecholamines and corticosteroids; secondary responses include increases in cardiac output, O_2 uptake and mobilization of energy substrates and disturbance of hydromineral balance; and tertiary responses extend to the level of organism and population, promoting inhibition of growth, reproduction and immune response, and reduced capacity to tolerate subsequent or additional stressors. Thus, the understanding of the mechanisms involved on the physiology of stress and of the environmental changes during cultivation, allows the identification of adverse conditions and development of methods to mitigate their effects on the health of farmed fish.

Introdução

Os peixes compõem um grupo bastante diverso, apresentando uma ampla variedade de hábitos alimentares, métodos reprodutivos, crescimento, ciclos de vida e respostas às alterações ambientais, de modo que para um cultivo algumas particularidades devem ser consideradas, além de se compreender (ao menos um pouco), o funcionamento de alguns sistemas do corpo destes animais. Deste modo, o estudo da fisiologia de peixes é importante para a piscicultura, pois com isto se tem o conhecimento não apenas do funcionamento dos diferentes sistemas corporais dos peixes, mas também das respostas às diversas alterações ambientais, e consequentemente é possível determinar as melhores condições de cultivo para cada espécie (Baldisserotto, 2002).

A piscicultura, como qualquer atividade de cultivo, tem como objetivo alcançar uma alta produtividade, com um mínimo de despesa, de modo a se obter o máximo de lucro possível. Alguns requisitos são necessários para se conseguir a lucratividade desejada, como a organização do criador quanto à administração de seu trabalho e de seus empregados e o conhecimento adequado da biologia da espécie utilizada no cultivo (Valenti et al., 2000). O maior desejo do piscicultor é que seus peixes cresçam rapidamente e apresentem boa conversão alimentar. Entretanto, para que este crescimento ocorra é importante que os animais recebam um manejo adequado, como alimentação balanceada, e que os fatores ambientais sejam mantidos dentro de níveis ideais (o termo manejo se refere às intervenções realizadas durante a criação, utilizadas de modo a otimizar a produção e a rentabilidade nas pisciculturas, de maneira compatível com a manutenção de adequada qualidade ambiental, possibilitando a oferta de produtos seguros ao consumidor). Deve-se considerar a preservação do meio ambiente e o

desenvolvimento social, além da produção lucrativa, tornando possível a realização desta atividade produtiva por longo tempo.

Estresse

O ambiente aquático é extremamente dinâmico com mudanças rápidas ou extremas na concentração de O_2 dissolvido, no pH e na salinidade. Os animais que vivem nesse ambiente enfrentam essas e outras alterações, que podem ocasionar estresse e reduzir a habilidade na manutenção da homeostase. Assim temos agentes estressores de natureza química, como por exemplo, variação na concentração de O_2 dissolvido; concentração elevada de amônia e nitrito, decorrente da degradação da matéria orgânica (Costa et al., 2004); presença de poluentes orgânicos e inorgânicos (Jorgensen, et al., 2002; Carvalho & Fernandes, 2006); e os de natureza física, como manuseio, alta densidade populacional, confinamento, captura ou transporte (Urbinati et al., 2004); e redução do nível de água dos corpos d'água, caracterizados pelos períodos de estiagem em regiões tropicais e subtropicais (Cadavid Garcia, 1984). Os fatores estressantes têm sido a principal causa das perdas de lucros na piscicultura, pois afetam o metabolismo e, consequentemente, o crescimento dos peixes.

E o que é estresse? Mesmo antes de se definir o termo estresse, piscicultores buscavam práticas de se melhorar a saúde dos peixes e diminuir a mortalidade. Existem diversas formas de se definir o que é estresse, basicamente poderíamos descrevê-lo como um estímulo que promove alterações na homeostase, envolvendo o Sistema Nervoso Autônomo (Cannon, 1935). Selye (1950, 1973) considerou o estresse como uma série de respostas, denominada como Síndrome Geral de Adaptação, a qual apresenta três estágios: (1) *reação de alarme*: uma série de alterações fisiológicas, como resposta inicial ao estímulo, ocorre de forma a compensar o distúrbio; (2) *resistência*: respostas fisiológicas de ajuste ou compensatórias para retorno à homeostase; (3) *exaustão*: a duração ou severidade dos distúrbios causados pela exposição ao estressor excede os limites, podendo levar a uma condição patológica ou morte. Segundo Brett (1958) estresse é um estado produzido pelo ambiente ou outro fator, que promove respostas adaptativas além da faixa normal de funcionamento do organismo, de modo que as chances de sobrevivência tornam-se significativamente reduzidas. Assim, a resposta ao estresse é como uma forma de adaptação, que promove uma melhor chance de sobrevivência frente a uma situação de medo ou ansiedade, permitindo uma divisão de recursos (para crescimento ou para reprodução, por exemplo), favorecendo a sobrevivência nessas situações. Entretanto, quando o agente estressor é crônico, o valor adaptativo à resposta pode ser comprometido e efeitos deletérios podem tornar-se aparentes.

Quando o peixe é exposto a um agente estressor ocorre a ativação de dois eixos neuroendócrinos: o eixo hipotálamo-sistema nervoso simpático-células cromafins (HSC), que resulta na liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), como produtos finais; e o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI) que libera os corticosteroides (cortisol e cortisona) (Figura 1). Mazeaud et al. (1977) introduziram a ideia de efeitos primários (nível endócrino, com liberação de cortisol) e secundários (metabolismo e

osmorregulação, com imunossupressão) de estresse em peixes. Assim, a ação destes hormônios em diversos órgãos-alvo, resulta em modificações bioquímicas e fisiológicas denominadas respostas secundárias ao estresse (Perry & Laurent, 1993; Wendelaar Bonga, 1997; Castro & Fernandes, 2009). Esta idéia se expandiu com o trabalho de Wedemeyer & McLeay (1981) devido à inclusão de um terceiro nível de estresse, relacionado à doença ou à resistência a ela. De forma geral, a resposta ao estresse apresenta três níveis (primário, secundário e terciário), que se incia no sistema endócrino e apresenta um aumento sucessivo até o nível de animal como um todo. Assim, temos as respostas primárias pela ativação dos centros cerebrais, o que resulta na liberação de catecolaminas (CAs) e de corticosteroides; as respostas secundárias incluem aumentos do débito cardíaco, da capacidade de transporte de oxigênio (O_2), da mobilização de substratos energéticos e dos distúrbios no balanço hidromineral; e as respostas terciárias se estendem para o nível de organismo e populacional, apresentando efeitos como inibição do crescimento, da reprodução e da resposta imune, além da redução da capacidade de tolerância a agentes estressores adicionais.

Resposta Primária – o Sistema Endócrino

Os agentes estressores são detectados pelo organismo e esta informação chega ao hipotálamo, o centro integrativo cerebral. Vias neurais aferentes do Sistema Nervoso Simpático partem do hipotálamo e seguem ao tecido cromafin (células cromafins), no rim cefálico, e este estímulo promove a liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina).

Os níveis destas CAs podem se elevar rapidamente e persistir por algumas horas. A liberação na corrente sanguínea leva a uma distribuição por todo o organismo, iniciando uma série de efeitos secundários, por exemplo, nos sistemas respiratório e cardiovascular (Mazeaud & Mazeaud, 1981). Estas rápidas alterações são denominadas como Respostas Primárias ao Estresse, sendo que o eixo que comanda a liberação destas CAs é conhecido como eixo HSC (Figura 1).

A resposta ao estresse em peixes inclui um grande aumento da taxa de captação de O_2 pelas brânquias, como resultado dos aumentos da taxa ventilatória, do fluxo sanguíneo branquial, da capacidade de difusão e do transporte de O_2 pelo sangue. Muitos destes efeitos ocorrem pela presença das catecolaminas circulantes, através dos mecanismos b-adrenérgicos (Randall & Perry, 1992; Castro & Fernandes, 2009). De modo a demonstrar este efeito das CAs, no trabalho realizado por Gallaugher et al. (1992), trutas arco-íris foram forçadas a nadar após a retirada cirúrgica do baço e mostraram redução significativa na tensão de O_2 arterial, enquanto que os valores de Hct não se alteraram; entretanto, nos peixes submetidos à mesma situação, sem a retirada do baço, a tensão arterial foi mantida e o Hct aumentou significativamente. Isto mostra claramente que a liberação de CAs promove a elevação dos valores de hematócrito, tanto devido ao aumento do volume dos eritrócitos, quanto pelo aumento do número de eritrócitos circulantes (contração esplênica), com consequente elevação da concentração de hemoglobina (Soldatov, 1996; Mariano, 2006). O estresse agudo causado pela captura, manejo, transporte, hipóxia, mudanças bruscas de temperatura entre outros, resulta em rápido aumento dos níveis de lactato plasmático e

muscular, diminuição do pH e da concentração de O_2 sanguíneos. Estas mudanças estão também associadas à liberação de CAs pelas células cromafins (Randall & Perry, 1992; Pickering & Pottinger, 1995; Castro & Fernandes, 2009). O aumento da perfusão branquial também ocorre devido ao efeito das CAs, entretanto, isto favorece a perda de íons por difusão do sangue para o meio externo, ocasionando um desequilíbrio iônico. As CAs também estimulam a glicogenólise, resultando na liberação de glicose do fígado para o sangue, levando a uma hiperglicemia (Nolan, 2000; Castro & Fernandes, 2009).

Neuropeptídeos, conhecidos como fatores liberadores de corticortrofinas (CRFs), são transportados a partir do hipotálamo para a hipófise e estimulam a produção e secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), mediada pelo hormônio melanócito estimulante (αMSH) e, possivelmente, por β-endorfina (Wendelaar Bonga, 1997). Este hormônio é liberado na corrente sanguínea, chegando às células interrenais (do rim cefálico), onde estimula a produção e liberação de hormônios corticosteroides (Donaldson, 1981). Na maioria dos peixes teleósteos, o cortisol é o principal hormônio corticosteroide. Os níveis plasmáticos de ACTH podem se elevar rapidamente após a exposição a um estressor, sendo isto seguido pela elevação dos níveis de cortisol circulantes. Esta liberação é controlada por *feedback*, sendo que altos níveis de cortisol na circulação promovem o *feedback* negativo na produção e liberação de ACTH pela hipófise. O cortisol também pode apresentar um *feedback* sobre o hipotálamo e influenciar na liberação dos CRFs. Estas interações entre hipotálamo e a liberação de ACTH e de cortisol são comandadas pelo eixo HHI (ver Figura 1).

As brânquias, intestino e fígado são órgãos-alvo do cortisol em peixes. Estes órgãos refletem as principais ações do cortisol em peixes: balanço hidromineral e metabolismo energético. Outras ações do cortisol incluem a redução do crescimento e a supressão dos sistemas reprodutivo e imune (Wendelaar Bonga, 1997; Castro & Fernandes, 2009). Este hormônio, o cortisol, apresenta funções mineralocorticoide e glicocorticoide. Uma função mineralocorticoide do cortisol é a estimulação da captação de íons como Na^+ e Cl^- em peixes quando em água doce, e a eliminação deste íons quando em água salgada (Laurent & Perry, 1989). O cortisol também promove a diferenciação das células-cloreto (encontradas, principalmente, nas brânquias), que aumentam a atividade de enzimas envolvidas no transporte de íons, como a Na^+/K^+-ATPase e Ca^{2+}-ATPase, e contêm muitas mitocôndrias (McCormick, 1995). As brânquias são importantes para os peixes, não apenas para as trocas gasosas, como também para o controle hidromineral, o equilíbrio ácido-base e o metabolismo nitrogenado (trocadores iônicos como Na^+/H^+ e Na^+/NH_4^+). O cortisol apresenta também efeitos sobre o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, dentro de sua função glicocorticoide. A administração de cortisol é frequentemente seguida de hiperglicemia em peixes, entretanto, isto ocorre exclusivamente pela ação glicogenolítica da CAs. Provavelmente, esta ação do cortisol sobre a produção de glicose hepática seja devido à gliconeogênese (Pickering, 1981; Vijayan et al., 1991; Wendelaar Bonga, 1997; Castro & Fernandes, 2009) e isto pode contribuir para a perda de peso durante um estresse crônico. Além disso, o cortisol pode promover o aumento dos níveis de ácidos graxos livres no plasma, devido à estimulação da lipólise (Sheridan, 1994).
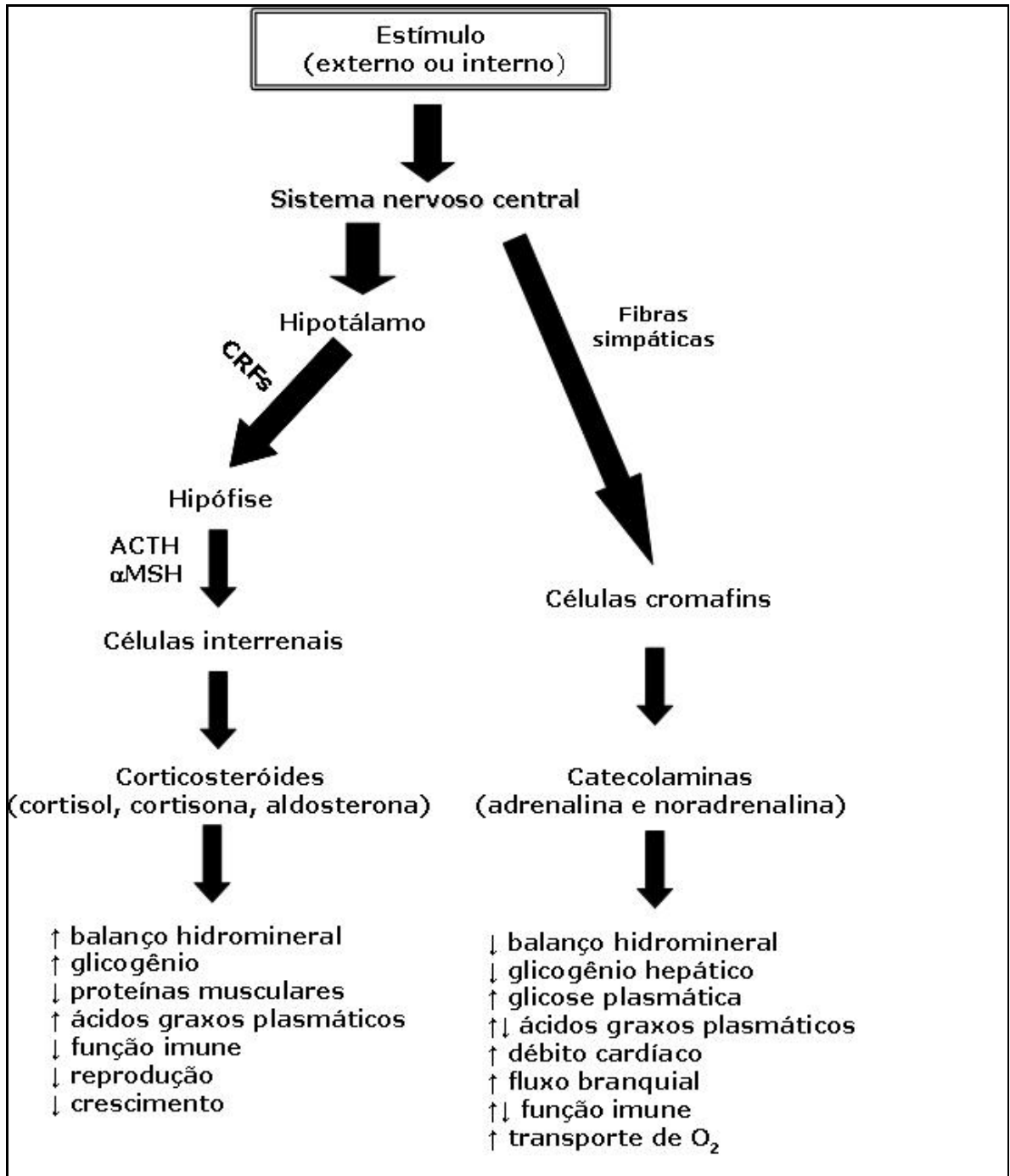
Figura 1. Diagrama ilustrativo das respostas ao estresse em peixes. ACTH: hormônio adenocorticotrópico; CRF: fatores liberadores de corticotrofinas; αMSH: hormônio melanócito estimulante; ↑: efeito estimulatório; ↓: efeito inibitório. Modificado de Wendelaar Bonga (1997).

O nível basal de cortisol plasmático varia entre as diferentes espécies de peixes. Por exemplo, em salmonídeos em condições de repouso, o valor se encontra em torno de 10 ng.mL^{-1}; em *Oreochromis niloticus,* o nível basal de cortisol está entre 22-78 ng.mL^{-1} (Barreto, 2002); em *Leuciscus cephalus* é de, aproximadamente, 250 ng.mL^{-1} (Pottinger et al., 2000) e em *Brycon amazonicus* em torno de 90 ng.mL^{-1} (Martins da Rocha et al., 2004; Oba, 2006). Entretanto, em situações de estresse agudo, como manipulação do animal, pode ocorrer um rápido aumento do cortisol plasmático, chegando a valores entre 40-200 ng.mL^{-1} nos salmonídeos. Estes níveis de cortisol plasmático podem retornar aos valores basais em 24 h. Entretanto, quando o peixe é exposto a estressores repetidamente ou cronicamente (de modo contínuo), o nível de cortisol plasmático se mantém elevado por dias, e até mesmo semanas (Pickering & Pottinger, 1989). Existem evidências de que a exposição crônica ao agente estressor leva a uma redução em número ou na sensibilidade dos receptores de cortisol nos tecidos dos peixes, podendo apresentar consequências nas respostas apresentadas frente a outros agentes estressores (Jobling, 1994).

Resposta Secundária – Alteração tecidual

A liberação de CAs e de cortisol tem como consequência alterações bioquímicas e fisiológicas conhecidas como Respostas Secundárias ao Estresse. Os efeitos metabólicos incluem hiperglicemia, hiperlactacemia, depleção das reservas glicogênicas, lipólise e inibição da síntese proteica. Um aumento do catabolismo de proteínas musculares e alterações nos níveis plasmáticos de aminoácidos, ácidos graxos livres e colesterol podem ocorrer (Pickering & Pottinger, 1995; Milligan, 2003; Martins da Rocha et al., 2004). Além disso, depleção das reservas de ácido ascórbico, particularmente do tecido interrenal, pode ocorrer. Alguns indicadores destas respostas secundárias ao estresse em peixes estão apresentados na Tabela 1.

Acreditava-se que as CAs eram a causa inicial da elevação dos níveis de glicose plasmáticos, devido à mobilização das reservas glicogênicas do fígado (glicogenólise), entretanto os corticosteroides podem contribuir para a manutenção da hiperglicemia, pela estimulação da gliconeogênese a partir de aminoácidos. Distúrbios osmóticos e iônicos podem ocorrer como resultado da diurese e da perda de eletrólitos sanguíneos. Podem também ocorrer mudanças hematológicas, tanto nos eritrócitos, quanto nos leucócitos (leucopenia). As CAs apresentam grande influência sobre o sistema cardiovascular, levando a alterações no fluxo sanguíneo, aumento na perfusão branquial, alteração na capacidade de transporte de O_2 pelo sangue, enquanto que os corticosteroides estimulam os mecanismo de transporte iônico presentes nas brânquias e nos rins. Estes efeitos são particularmente importantes durante o período de recuperação do estresse, quando o peixe procura manter o suprimento de O_2 para os tecidos e recuperar o equilíbrio osmótico e iônico.

A exposição dos peixes aos diferentes estressores ambientais pode levar ao aumento de sua susceptibilidade aos agentes infecciosos (vírus, bactérias e fungos) e parasitários (protozoários, monogeneas, nematodas e crustáceos). O parasitismo é também considerado um agente estressor para os peixes e promove alterações osmorregulatórias e hematológicas (Castro,

2006; Tavares-Dias et al., 2007; Araújo et al., 2009; Castro & Fernandes, 2009).

Tabela 1. Alguns exemplos de respostas secundárias utilizadas como indicadores de estresse em peixes (Barton & Iwama, 1991).

Metabolismo	Glicose plasmática
	Ácido lático plasmático
	Glicogênio hepático e muscular
	Colesterol plasmático
Hematologia	Hematócrito
	Leucócrito
	Contagem de eritrócitos
	Contagem de trombócitos
	Tempo de coagulação
	Concentração de hemoglobina
Hidrominerais	Cloreto plasmático
	Sódio plasmático
	Potássio plasmático
	Proteína plasmática
	Osmolalidade plasmática
Estruturais	Tamanho e número das células interrenais
	Diâmetro do núcleo das células interrenais
	Morfologia do tecido gástrico
	Índice organossomático
	Fator de condição

Resposta Terciária – Efeitos duradouros

A exposição crônica aos agentes estressores pode induzir uma série de alterações patológicas, como redução no sucesso reprodutivo, diminuição da taxa de crescimento e da resistência a doenças, sendo estas conhecidas como Respostas Terciárias ao Estresse.

De acordo com Jobling (1994) a exposição a agentes estressores como águas ácidas e níveis subletais de agentes tóxicos, levam à redução do sucesso reprodutivo em várias espécies de peixes e isto parece ser mediado pelos corticosteroides. Em salmonídeos isto ocorre devido à supressão do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, resultando na redução dos níveis dos hormônios sexuais. Nos machos, a exposição crônica aos estressores pode resultar na redução do conteúdo de gonadotropina (GtH) na hipófise, redução dos níveis plasmáticos de testosterona e 11-ceto-testosterona, diminuindo o tamanho dos testículos e a contagem de espermatozoides, quando comparado com peixes não-estressados. Em fêmeas, a redução do conteúdo de GtH pode ser acompanhado pela redução de estradiol circulante e diminuição de vitelogenina plasmática, precursor do vitelo. O resultado geral pode ser o impedimento da vitelogênese, reduzido tamanho do ovário e dos ovos e pode ocorrer atraso no tempo de ovulação, quando comparado com peixes não-estressados (Pankhurst & Van der Kraak, 1997). Outro efeito do estresse sobre o sucesso reprodutivo está relacionado com a mortalidade de ovos e sobrevivência de larvas. Tais efeitos foram demonstrados em truta arco-íris, que após a exposição a agentes estressores durante o período de vitelogênese e desenvolvimento gonadal ocorreu a redução significativa da sobrevivência da prole (60% *versus* 85% de sobrevivência, dos peixes estressados e não-estressados, respectivamente) (Jobling, 1994).

Uma das respostas mais notáveis do peixe, após a exposição a alguma forma de estressor ambiental, é a cessação da alimentação. Este aspecto acompanhado dos efeitos catabólicos das CAs e dos corticosteroides sobre as reservas energéticas dos tecidos corporais, resulta num reduzido crescimento nos peixes estressados. O cortisol, provavelmente, exerce um efeito inibitório sobre a síntese proteica e isto pode ser utilizado como indicador de crescimento somático. A razão dos ácidos nucléicos (RNA: DNA) nos tecidos corporais dos peixes (tecidos muscular e hepático) é grandemente influenciada pelo jejum e pela restrição alimentar. Por exemplo, peixes expostos a metais pesados, cianeto e outros compostos orgânicos mostraram diminuição da taxa de RNA:DNA e marcante diminuição do crescimento. Deste modo, quando o peixe é exposto a agentes estressores uma série de respostas é iniciada, sendo que se o estresse é severo ou duradouro, os níveis mais altos da organização biológica tornam-se afetados (Jobling, 1994).

Regulação do crescimento

O hormônio do crescimento (GH) é liberado na corrente sanguínea pela hipófise, sendo controlado por dois hormônios secretados pelo hipotálamo: o hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH), que exerce função estimuladora, e a somatostatina (SST), com ação inibidora. O GH estimula a produção e liberação de IGF-1 (“insulin-like growth factor”), que afeta a divisão e a diferenciação celular. A insulina, produzida pelo pâncreas, possui efeitos promotores do crescimento, podendo tanto reagir com receptores de IGF-1, quanto otimizar a produção de IGF-1, através da modulação da afinidade dos receptores hepáticos do GH. Os hormônios tireoidianos, tiroxina (T_4) e triiodotironina (T_3) estão envolvidos no processo de crescimento

somático, apresentando efeitos na secreção de GH e na resposta celular ao IGF-1 (Figura 2).
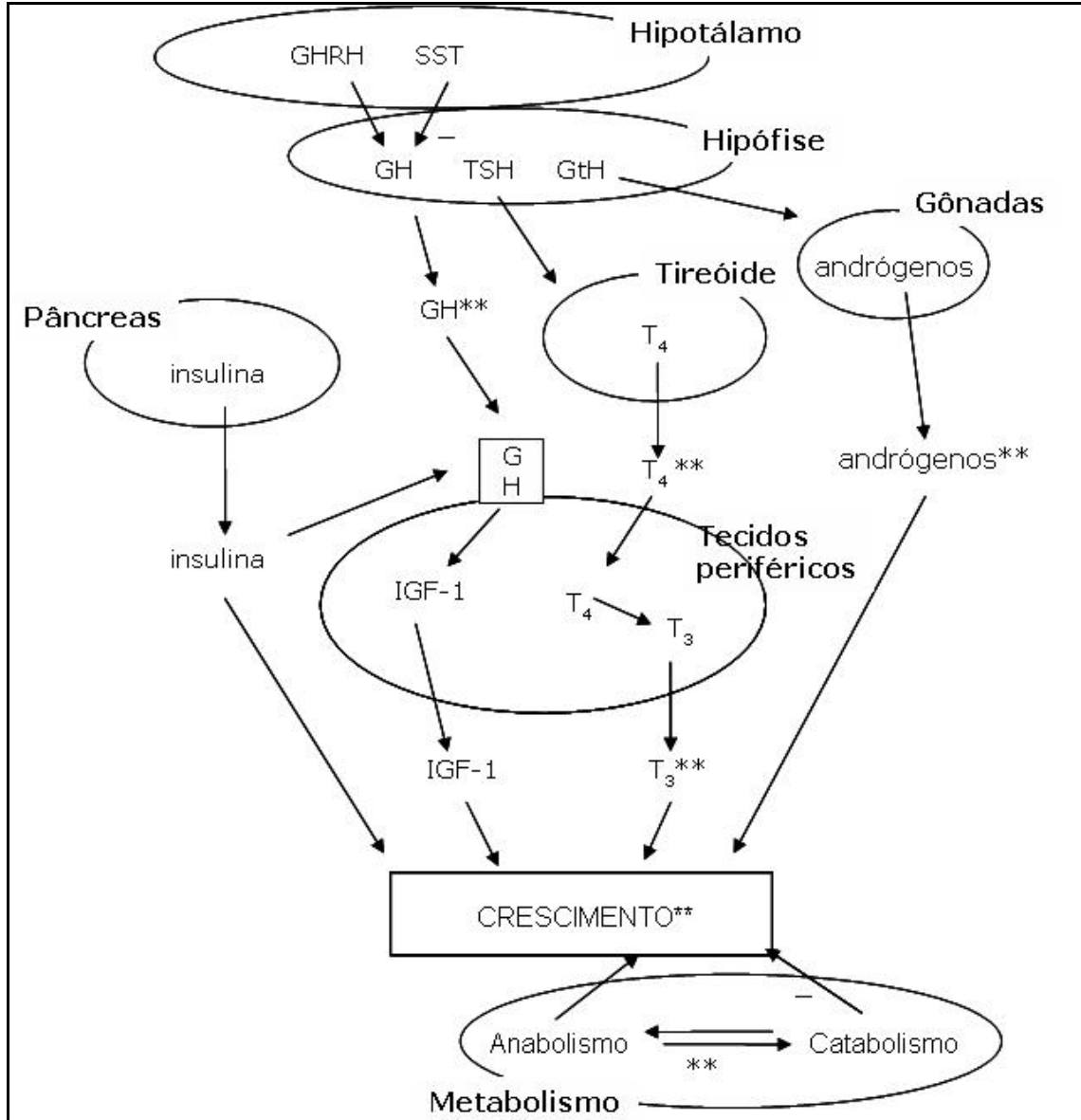
Figura 2. Resumo ilustrativo dos processos endócrinos e metabólicos do controle do crescimento em peixes teleósteos, mostrando os níveis nos quais o estresse apresenta efeitos inibitórios (asteriscos). GH, hormônio do crescimento; GHRH hormônios liberadores de GH; GtH gonadotrofina; IGF-1 "insulin-like growth factor; SST somatostatina; TSH hormônio estimulador da tireoide; T_3 triiodotironina; T_4 tiroxina. Fonte: Pankhurst & Van der Kraak (1997).

O estresse pode interferir de várias formas no sistema de regulação do crescimento. Uma das formas é a ação inibitória sobre o crescimento, através dos níveis plasmáticos de T_3 e T_4, direta ou indiretamente, pela alteração nutricional causada pela redução na quantidade de ingestão de alimento induzida pelo estresse, com efeito do cortisol sobre este processo (Pickering, 1993). Os efeitos anabólicos de andrógenos, principalmente a testosterona e o 11-ceto-testosterona, parecem ser suprimidos pelo estresse, tanto o estresse agudo quanto o crônico, nos peixes teleósteos, sendo estas alterações ligadas ao aumento dos níveis plasmáticos de cortisol (Pankhurst & Van der Kraak, 1997).

Situações de estresse

Dentre os diversos agentes estressores, que podem estar presentes em cultivo intensivo, a qualidade da água, manipulação dos peixes, alimentação e interações biológicas são os mais importantes do ponto de vista da produção.

A - Qualidade da água

A qualidade da água na saúde e condição fisiológica dos peixes varia consideravelmente em função da espécie, tamanho e idade, entre outros fatores. A dureza total, pH, O_2 dissolvido, temperatura, por exemplo, podem alterar os efeitos fisiológicos. Por exemplo, concentrações de metais pesados, como zinco e cobre, provocam danos nas brânquias em água ácida e com baixa dureza total, entretanto, em água alcalina e de dureza total acima de 200 $mg.L^{-1}$ $CaCO_3$, são pouco problemáticas. Outro exemplo: a quantidade de O_2 dissolvido pode promover mudanças na velocidade do batimento opercular, modificando assim o nível tóxico de outros elementos presentes na água, devido ao aumento ou diminuição da exposição do epitélio branquial. Entretanto, existe um consenso com relação aos parâmetros da qualidade da água necessários para garantir e proteger a saúde dos animais em piscicultura intensiva (Tabela 2).

Tabela 2. Limites recomendados de alguns parâmetros químicos para garantir as melhores condições de saúde de peixes em condições de criação intensiva (Wedemeyer, 1997).

Parâmetros	Limites recomendados
Alcalinidade total	>20 mg.L^{-1} $CaCO_3$
Alumínio	<0,075 mg.mL^{-1}
Amônia (não-ionizada)	<0,02 mg.L^{-1}
Arsênico	<0,4 mg.L^{-1}
Cádmio	<0,0005 mg.L^{-1} (água mole) <0,005 mg.L^{-1} (água dura)
Cálcio	>5 mg.L^{-1}
Chumbo	<0,02 mg.L^{-1}
Cloreto	>4,0 mg.L^{-1}
CO_2	<5-10 mg.L^{-1}
Cobre	<0,0006 mg.L^{-1} (água mole) <0,03 mg.L^{-1} (água dura)
Ferro	< 0,1 mg.L^{-1}
Mercúrio	< 0,0002 mg.L^{-1}
Nitrato (NO_3^-)	< 1,0 mg.L^{-1}
Nitrito (NO_2^-)	< 0,1 mg.L^{-1}
Oxigênio	>6 mg.L^{-1} (águas frias) >4 mg.L^{-1} (águas quentes)
pH	entre 6 e 9
Selênio	<0,01 mg.L^{-1}
Sólidos totais dissolvidos	<200 mg.L^{-1}
Sólidos totais em suspensão	<80 mg.L^{-1}
Zinco	<0,005 mg.L^{-1}

B - Práticas de cultivo

O manejo é um procedimento presente em quase todas as práticas comuns da piscicultura, devido à necessidade de realização de biometrias, separação ou repicagem do lote e também para o transporte dos peixes. Muito embora possa ser uma condição de curta duração, pode alterar muito os parâmetros fisiológicos do animal. Estes procedimentos são causadores de

estresse agudo, promovendo inclusive injúrias físicas nos animais, devendo ser realizados de maneira cautelosa e rápida, sendo muitas vezes necessário o uso de anestésicos e outros produtos, como sal e antibióticos, e o treinamento do pessoal responsável pela tarefa. Os anestésicos são utilizados para reduzir o metabolismo e, com isto, o objetivo é reduzir o consumo de O_2 e a excreção de metabólicos tóxicos, além de prevenir as injúrias físicas causadas pelas hiperatividade dos peixes, em decorrência do manejo pré-transporte.

O uso do sal (NaCl ou $CaCl_2$) pode reduzir alterações fisiológicas como a hiperglicemia e a hipercortisolemia, que ocorrem após o transporte. Além disso, nas mais variadas condições adversas que os peixes podem estar expostos, acentuam-se a perda de sais do sangue para a água. Consequentemente, promovendo excessiva hidratação do corpo, desta maneira sais minerais adicionados à água durante o transporte, protegem contra a perda de eletrólitos e contra as disfunções osmorregulatórias (Carmichael et al., 1984; Carneiro & Urbinati, 1999). Para restabelecer o equilíbrio osmorregulatório, os peixes gastam energia extra, deprimindo a sua resistência e o seu sistema imunológico, tornando-os mais susceptíveis às doenças (Carneiro & Urbinati, 2001). De acordo com Kubitza (2007), para fins de alívio do estresse do manuseio e transporte podem ser utilizadas concentrações de sal entre 0,5% a 0,8%, valores próximos à concentração de sais no sangue dos peixes. Assim, para tratamentos de infecções por parasitos, fungos e bactérias, o sal pode ser aplicado na forma de banhos rápidos sob alta concentração (2% a 3%). Assim, o sal pode ser usado em diversas situações nas pisciculturas como na prevenção e controle de doenças; alívio do estresse relacionado às despescas, biometrias, classificações por tamanho, transferências dos peixes e confinamento durante a depuração; alívio do estresse do transporte de curta e longa duração; e como amenizador de condições ambientais adversas (toxicidade por nitrito, inflamação das brânquias, entre outros).

Os danos e inflamações causadas ao epitélio branquial podem ocorrer devido à infestação por parasitos, ao uso de produtos químicos irritantes, à presença de argila em suspensão na água, ao excesso de material orgânico particulado e à frequente exposição dos peixes a baixos níveis de O_2 e outras condições inadequadas de qualidade de água (Kubitza, 2007; Cavichiolo, 2009). Os herbicidas são utilizados na prevenção de infestação em um determinado local por vegetação indesejável, como por exemplo, em taludes de viveiros de piscicultura para minimizar o crescimento exagerado da vegetação. Todavia, estudos com um tipo específico, o Roundup®, demonstrou que sua toxicidade se deve a um componente de ação secundária utilizado em sua composição, não precisamente ao glifosato em si (Porto, 2005).

Em situações de hipóxia, que podem ocorrer, por exemplo, quando o número de peixes no tanque está acima do normal (alta densidade de estocagem), devido ao aumento da demanda por O_2, ocorre aumento de resíduos metabólicos como o dióxido de carbono e a amônia. A hipóxia também ocorre à noite, no momento em que todos os seres do reservatório, inclusive algas e macrófitas (plantas aquáticas), consomem O_2. A recomendação é de que a concentração de O_2 esteja entre 4 a 7 $mg.L^{-1}$. Na piscicultura intensiva deve-se ter disponibilidade de água de boa qualidade,

com vazão adequada para o fornecimento do O_2 e para diluir os resíduos metabólicos (Carneiro & Urbinati, 1999). Durante períodos de 12h de exposição à hipóxia, os peixes apresentam os níveis de cortisol e de lactato plasmático alterados e quando o peixe retorna à normóxia, os níveis desses parâmetros também retornam, em menos de 6h. Uma alternativa para solucionar o problema é a utilização de aeradores, para permitir a renovação do O_2 na água (Porto, 2005).

Entre os desafios ambientais naturais da Amazônia temos as oscilações dos níveis de O_2, valores extremos de pH de alguns corpos de água e vazantes extremas, que são situações potencialmente estressantes para os peixes. A respiração aérea em peixes pode ocorrer por meio do uso de várias estruturas: pulmão em piramboia *Lepidosiren paradoxa;* vascularização bucal e opercular em poraquê *Electrophorus eletricus*; vascularização do estômago e do intestino em calictídeos e loricariídeos; bexiga natatória modificada em pirarucu *Arapaima gigas* e em jeju *Hoplerythrinus unitaeniatus*, possibilitando uma melhor utilização do O_2 disponível no ar atmosférico (Reid et al., 2000; Val et al., 2006; Mariano, et al., 2009).

C - Alimentação

A alimentação dos peixes é uma atividade imprescindível durante o cultivo, visto que, os animais estão confinados em ambientes com pouca chance de obtenção de nutrientes. Normalmente, o estresse associado à alimentação está relacionado à redução da resistência a doenças e ao ataque por parasitas observado após o fornecimento contínuo de alimento deficiente em macro ou micronutrientes.

A identificação das doenças nutricionais é algo muito complexo, devido à presença de um estado infeccioso mais evidente. Estudos de manipulação de dietas com o intuito de aumentar a resistência às doenças e a função imune dos peixes são bastante promissores. Assim, formulações de dietas são constantemente revisadas a fim de fornecer o melhor balanço dos componentes essenciais na dieta, principalmente, em piscicultura intensiva (Nutrient Research Council, 1993).

De acordo com Pavanelli et al. (2008), a produção de dietas equilibradas ocorre para um grande número de espécies de peixes. Entretanto, muitas espécies, especialmente as tropicais, têm demonstrado grande potencialidade para a piscicultura, porém ainda pouco se conhece sobre suas exigências nutricionais, dificultando a formulação de dietas adequadas. Existe uma relação estreita entre um bom estado nutricional e a resistência a certas doenças, o que reflete no estado geral dos peixes cultivados. Os sintomas mais relevantes das doenças de etiologia nutricional são: escoliose ou lordose, catarata, erosão das nadadeiras, fígado com excesso de gordura, exoftalmia e hemorragia nas nadadeiras e no tegumento (Tabela 4). O estresse provocado por uma nutrição deficiente potencializa a infecção por bactérias oportunistas como *Aeromonas hydrophila* ou *Flexibacter columnaris*, bem como facilita a infecção por certos protozoários.

O conhecimento das exigências nutricionais de macronutrientes, como carboidratos, lipídios e proteínas, dos peixes são extremamente importantes, pois sua deficiência está ligada ao estresse e às doenças. Um exemplo é que

o metabolismo de carboidratos é significativamente afetado pelas respostas primárias e secundárias ao estresse (Mazeaud et al., 1977). A perda de peso ou a redução do crescimento dos peixes são aspectos ligados à inadequação dos níveis proteicos na dieta, inclusive podendo ter relação com as respostas secundárias ao estresse (gliconeogênese, por exemplo) (Pickering, 1981; Wendelaar Bonga, 1997). Além disso, a deficiência em proteínas na dieta pode afetar negativamente o sistema imunológico, visto que, as imunoglobulinas, citocinas, hormônios e enzimas, são proteínas (Carneiro & Urbinati, 1999). Os lipídios da dieta fornecem os ácidos graxos essenciais necessários para o adequado crescimento e desenvolvimento, inclusive determinados ácidos graxos poliinsaturados estão envolvidos em processos imunológicos (Fletcher, 1997).

Já os micronutrientes (minerais e vitaminas) são importantes na alimentação dos peixes. Entretanto, a deficiência dos minerais é complicada de ser detectada, visto que os peixes podem absorver alguns elementos como cálcio, magnésio, sódio, potássio, ferro, zinco, cobre e selênio, do ambiente. Estes elementos estão envolvidos em processos vitais, como componentes de hormônios e enzimas. Antioxidantes (glutationa, arginina, citrulina, taurina, creatina, selênio, zinco, vitamina E, vitamina C, vitamina A e polifenóis) e enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutationa redutase e glutationa peroxidase) exercem ações sinergísticas na retirada de radicais livres do organismo. Esses radicais livres quando não eliminados do organismo podem promover o estresse oxidativo levando à oxidação de biomoléculas e danos celulares (Fang et al., 2002; Wilhelm Filho, et al., 2000; Oba, 2006; Santos, 2006). As vitaminas, como a vitamina C, têm sido utilizadas em experimentos de nutrição com o objetivo de aumentar a competência imunológica e a resistência dos peixes a doenças (Fletcher, 1997; Andrade et al., 2006). Suplementação de vitamina C na dieta de matrinxã *B. amazonicus* não aumentou a resistência à infecção por *Aeromonas hydrophila*, mas após 15 dias da inoculação desta bactéria, os peixes retornaram à sua homeostase fisiológica (Andrade et al., 2006). A administração de vitamina C na dieta de tambaqui, *Colossoma macropomum*, melhora de forma significativa a resistência a agentes estressores, em particular a hipóxia e resulta em menor infestação por monogenóideos. A substituição de parte da ração por frutos ricos em vitamina C, advindos da região de várzea da Amazônia, como o camu-camu, promoveu uma maior resistência a agentes estressores diversos. De acordo com Val et al. (2006), a dieta natural das espécies de peixes da Amazônia é que promove a rusticidade natural desses peixes, o que inclui a resistência ao estresse e a doenças.

Tabela 4. Principais doenças provocadas por deficiência ou toxicidade de nutrientes (Pavanelli et al., 2008).

Doença	Deficiência de	Toxicidade de
Escoliose ou lordose	Triptofano, magnésio, fósforo, vitamina C, ácidos graxos essenciais	Leucina, vitamina A, óleo oxidado de peixe
Catarata	Metionina, triptofano, zinco, magnésio, cobre, selênio, manganês, vitamina A, riboflavina	Colina, óleo oxidado de peixe
Erosão das nadadeiras	Lisina, triptofano, riboflavina, inositol, niacina, zinco, vitamina C	Vitamina A
Fígado com excesso de gordura	Colina, ácidos graxos essenciais	Óleo oxidado de peixe
Exoftalmia	Ácido pantotênico, niacina, ácido fólico, vitamina A, vitamina E	Óleo oxidado de peixe
Hemorragia	Riboflavina, ácido pantotênico, niacina, tiamina, inositol, vitamina C, vitamina A	Óleo oxidado de peixe

D - Interações biológicas

As interações biológicas são importantes fontes de estresse em piscicultura. Interações de dominância entre os indivíduos são relativamente comuns em sistemas aquícolas. Os animais subordinados podem apresentar problemas como danos nas nadadeiras, perda de escamas, crescimento reduzido, alterações patológicas no tecido gastrointestinal e aumento na susceptibilidade a doenças infecciosas. O crescimento reduzido pode ocorrer devido à diminuição ao acesso ao alimento e à maior demanda energética causada pelo estresse crônico. A separação dos peixes por tamanho e redistribuição em viveiros diferentes, permite o monitoramento e o controle, de modo que a retirada dos peixes maiores (geralmente dominantes) permite o crescimento dos peixes, anteriormente subordinados, dentro da hierarquia de dominância. Além disso, uma ampla distribuição do alimento em sistema intensivo de criação pode minimizar os problemas de formação de classes de tamanho diferentes entre os peixes (Schreck et al., 1997; Liao & Chang, 2002; Dou et al., 2004).

A utilização do exercício físico em peixes de natureza reofílica pode trazer benefícios, como diminuição da hierarquia de dominância entre os indivíduos, além de permitir o crescimento dos animais de modo homogêneo (Davison & Goldspink, 1977; Woodward & Smith, 1985; Totland et al., 1987; Davison, 1997). Estudos com matrinxã *Brycon cephalus*, indicaram que o exercício físico em velocidades moderadas (treinamento de baixa intensidade) promove o crescimento dos animais (cerca de três vezes maior que os animais não exercitados), com maior homogeneidade de tamanho entre os animais, possibilitando ao produtor obter melhor relação custo-benefício. Além disso, obteve-se redução nos níveis plasmáticos de cortisol e de glicose e manutenção da concentração de glicogênio hepático, indicando que o treinamento em baixa intensidade promove a diminuição do estresse em peixes (Oba, 2006).

Considerações finais

Em piscicultura, o aumento da produção pode ser alcançado com o maior número de peixes por área cultivada, controle de alimentação e dos níveis de oxigênio dissolvido na água. Entretanto, a elevação das densidades de animais e a imposição das atividades rotineiras, que tais sistemas exigem, ocasionam estresse e, consequentemente, risco ao desempenho dos peixes. O sucesso reprodutivo de espécies economicamente importantes é decisivo para os demais setores da cadeia produtiva, visto que os processos de maturação e desova estão estreitamente associados com a fisiologia do estresse em peixes, sendo assim os agentes estressores são ameaças à qualidade dos gametas e da progênie. Deve-se atentar ao fato de que no ambiente em que os peixes são mantidos durante o cultivo, pode-se proporcionar uma grande variedade de agentes estressores, com possibilidade de diversas interações. Isto torna a tomada de decisões extremamente complicada e muito mais cuidadosa, de modo a amenizar o nível de estresse e minimizar perdas. Deste modo, o entendimento básico da fisiologia do estresse e das alterações ambientais que o peixe possa estar exposto, possibilita a identificação das condições adversas e o desenvolvimento de métodos que atenuem os seus efeitos na saúde de peixes cultivados.

Agradecimentos

Ao CNPq e CAPES, pelas bolsas concedidas aos autores; à Piscicultura Águas Claras pelo fornecimento dos peixes e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Convênio UFSCar/Unesp.

Referências

ANDRADE, J. I. A.; BRASIL, E. M.; ONO, E. A.; MATSUURA, T.; MENEZES, G. C.; FERNANDES, E. B.; SOUZA, R. Y. T. B.; OLIVEIRA, S. R.; TAVARES-DIAS, M.; AFFONSO, E. G. 2006. Influencia de dieta suplementada com vitamina C nas respostas fisiológicas do matrinxã, *Brycon amazonicus*,

após infecção por *Aeromonas hydrophila*. *CIVA2006*, 955-961. *Disponível em: http://www.civa2006. org*.
ARAÚJO, C. S. O.; TAVARES-DIAS, M.; GOMES, A. L. S.; ANDRADE, S. M. S.; LEMOS, J. R. G.; OLIVEIRA, A. T.; CRUZ, W. R.; AFFONSO, E. G. Infecções parasitárias e parâmetros sanguíneos em *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) cultivados no estado do Amazonas, Brasil. In: TAVARES-DIAS, M. (Org). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá, p. 389-424.
BALDISSEROTTO, B. 2002. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. Santa Maria, RS: Editora UFSM.
BARRETO, R. E. 2002. Estressor social facilita estresse na tilápia-do-Nilo? 38 f. Dissertação (Mestrado) – Unesp, Botucatu.
BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis*., 1:3-26.
BRETT, J. R. 1958. Implications and assessment of environmental stress. In: LARKIN, P. A. (Ed.). *The investigation of fish-power problems*. Vancouver: MacMillan Lectures in Fisheries, p. 69-83.
CADAVID GARCIA, E. A. 1984. *O clima do Pantanal Mato-grossense*. Corumbá: Embrapa Pantanal.(Circular técnica, 14).
CANNON, W. 1935. Stress and strains of homeostasis. *American Journal of the Medical Sciences*, 189:1-14.
CARMICHAEL, G. J.; TOMASSO, J. R.; SIMCO, B. A.; DAVIS, K. B. 1984. Confinement and water quality induced stress in largemouth bass. *Trans. Am. Fish. Soc*., 113:767-777.
CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. 1999. “Stress” e crescimento de peixes em piscicultura intensiva. In: CYRINO, J. E. P.; MIYADA, V. S.; PEZZATO, L. E. (Ed.). *III Simpósio sobre manejo e nutrição de peixes*. Campinas, p. 25-40.
CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. 2001. Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) during transport. *Aquac. Research*, 32:297-304.
CARVALHO, C. S.; FERNANDES, M. N. 2006. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture*, 251:109-117.
CASTRO, F. J. 2006. Relação parasito-hospedeiro entre pacu, *Piaractus mesopotamicus* e o ectoparasito *Dolops carvalhoi* (Lemos de Castro, 1949). Respostas Fisiológicas, Morfofuncionais e do Sistema Imune Não-adaptativo do Hospedeiro Frente à Infestação Experimental. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
CASTRO, F. J.; FERNANDES, M. N. 2009. Efeitos da infestação por parasitos argulídeos na fisiologia e mecanismos de defesa inata em peixes cultivados. In: TAVARES-DIAS, M. (Org). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá, p. 361-388.
CAVICHIOLO, F. 2009. Histologia: ferramenta relevante para peixes cultivados. In: TAVARES-DIAS, M. (Org). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá, p. 602-624.
COSTA, O. F. T.; FERREIRA, D. J. S.; MENDONÇA, F. L. P.; FERNANDES, M. N. 2004. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum*

(Serrasalminae) to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture*, 232:627-636.

DAVISON, W. 1997. The effects of exercise training on teleost fish, a review of recent literature. *Comp. Biochem. Physiol*., 117A:67-75.

DAVISON, W.; GOLDSPINK, G. 1977. The effect of prolonged exercise on the lateral musculature of the brown trout (*Salmo trutta*). *J. Exp. Biol*., 70:1-12.

DONALDSON, E. M. 1981. The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. In: PICKERING, A.D. *Stress and fish*. London: Academic Press, p. 11-47.

DOU, S.-Z.; MASUDA, R.; TANAKA, M.; TSUKAMOTO, K. 2004. Size hierarchies affecting the social interactions and growth of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 233:237-249.

FANG, Y.-Z.; YANG, S.; WU, G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18:872-879.

FLETCHER, T. C. 1997. Dietary effects on stress and health. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPETER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Ed.). *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: University Press, p. 223-245.

GALLAUGHER, P. M.; AXELSON, M.; FARRELL, A. P. 1992. Swimming performance and haematological variables in splenectomized rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol*., 171:301-314.

JOBLING, M. 1994. *Fish Bioenergetics*. London: Chapman & Hall.

JORGENSEM. E. H.; VIJAYAN, M. M.; ALURU, N.; MAULE, A. G. 2002. Fasting modifies Aroclor 1254 impact on plasma cortisol, glucose, and lactate responses to a handling disturbance in *Arctic charr*. *Comp. Biochem. Physiol*., 132C:235-245.

KUBITZA, F. 2007. A versatilidade do sal na piscicultura. *Panorama da Aquicultura*, 103:14-23.

LAURENT, P.; PERRY, F. 1989. Effects of cortisol on gill chloride cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res*., 250:429-442.

LIAO, I. C.; CHANG, E. Y. 2002. Timing and factors affecting cannibalism in red drum *Sciaenops ocellatus* larvae in captivity. *Environ. Biol. Fish*, 63:229-233.

MARIANO, W. S. 2006. Respostas fisiológicas e bioquímicas do jeju, *Hoplerytrhinus unitaeniatus* (Characiformes, Erytrhinidae) a exposição aérea. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sã Carlos, São Carlos, SP.

MARIANO, W. S.; OBA, E. T.; SANTOS, L. R. B.; FERNANDES, M. N. 2009. Respostas fisiológicas de jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae) expostos ao ar atmosférico. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim*., 10:210-223.

MARTINS DA ROCHA, R.; CARVALHO, E. G.; URBINATI, E. C. 2004. Physiological responses associated with capture and crowding stress in matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Aquaculture Research*, 35:245-249.

MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F. 1981. Adrenergic responses to stress in fish. In: PICKERING, A. D. *Stress in fish*. London: Academic Press, p. 49-75.

MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E. M. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 106:201-212.

McCORMICK, S. D. 1995. Hormonal control of gill Na^+,K^+-ATPase and chloride cell function. In: WOOD, C. M.; SHUTTLEWORTH, T. J. (Ed.). *Cellular and molecular approacher to fish ionic regulation*. San Diego: Academic, p. 285-315.

MILLIGAN, C. L. 2003. A regulatory role for cortisol inmuscle glycogen metabolism in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *J. Exp. Biology*, 206:3167-3173.

NOLAN, D. T. 2000. *Skin response of fish to stressors*. Tese (Doutorado) – Universidade Católica de Nijmegen, Holanda.

NUTRIENT RESEARCH COUNCIL. 1993. *Nutrient Requirement in Fish*. Washington, DC: National Academic Press.

OBA, E. T. 2006. Efeitos do exercício físico moderado e da suplementação da dieta com vitamina C no crescimento e no metabolismo de matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Teleostei: Characidae). 99 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

PANKHURST, N. W.; VAN DER KRAAK, G. 1997. Effects of stress on reproduction and growth of fish. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Ed.). *Fish stress and health in aquaculture*. United Kingdom: Cambridge University Press, p. 73-93.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. 2008. *Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. 3. ed. Maringá: EDUEM.

PERRY, S. F.; LAURENT, P. 1993. Environmental effects on fish gill structure and function. In: RANKIN, J. C.; JENSEN, F. B. *Fish Ecophysiology*. London: Chapman & Hall, p. 231-264.

PICKERING, A. D. 1981. *Stress and fish*. London: Academic Press.

PICKERING, A. D. 1993. Growth and stress in fish production. *Aquaculture*, 111:51-63.

PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G. 1989. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol. Biochem*., 7:253-258.

PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G. 1995. Biochemical effects of stress. In: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. (Ed.). *Environmental and ecological biochemistry*. Amsterdam: Elsevier, p. 349-379.

PORTO, M. S. A. 2005. *Indicadores de estresse em peixes da Amazônia: sensibilidade em face do tipo de estressor.* 38 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Manaus, Manaus.

POTTINGER, T. G.; CARRICK, T. R.; APPLEBY, A.; YEOMANS, W. E. 2000. High blood cortisol levels and low cortisol receptor affinity: is the chub, *Leuciscus cephalus*, a cortisol-resistant teleost? *Gen. Comp. Endocrinol*., 120:108-117.

RANDALL, D. J.; PERRY, S. F. 1992. Catecholamines. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; FARRELL, A. P. *Fish Physiology*. San Diego: Academic Press, p. 255-300.

REID, S. G.; SUNDIN, L.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T.; MILSOM, W. K. 2000. Cardiovascular and respiratory reflexes in the tropical fish traíra (*Hoplias malabaricus*): CO2/pH chemoreceptors. *Respiration Physiology*, 120:47-59.

SANTOS, L. R. B. 2006. *Efeito da dieta suplementada com vitamina E e cobre nas respostas metabólicas e antioxidantes de matrinxã, Brycon cephalus (Günther, 1869), frente à hipóxia*. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

SCHRECK, C. B.; OLLA, B. L.; DAVIS, M. W. 1997. Behavioral responses to stress. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Ed.). *Fish stress and health in aquaculture*. United Kingdom: Cambridge University Press, p. 145-170.

SELYE, H. 1950. Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal*, 1(4667):1383-1392.

SELYE, H. 1973. The evolution of the stress concept. *American Scientist*, 61:692-699.

SHERIDAN, M. A. 1994. Regulation of lipid metabolism in poikilotermic vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol*. 107B:495-508.

SOLDATOV, A. A. 1996. The effect of hypoxia on red blood cells of flounder: a morphologic and autoradiographic study. *J. Fish Biol*., 48:321-328.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R.; ONAKA, E. M.; REZENDE, P. C. B. 2007. Changes in blood parameters of hybrid tambacu fish parasitized by *Dolops carvalhoi* (Crustacea, Branchiura), a fish louse. *Vet. Arhiv*, 77:355-363.

TOTLAND, G. K.; KRYVI, H.; JØDESTØL, K. A.; CHRISTIANSEN, E. N.; TANGERÃS, A.; SLINDE, E. 1987. Growth and composition of the swimming muscle of adult Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during long-term sustained swimming. *Aquaculture*, 66:299-313.

URBINATI, E. C.; ABREU, J. S.; CAMARGO, A. C. S.; LANDINES, M. A. 2004. Loading and transport stress in juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*) at various densities. *Aquaculture*, 229:389-400.

VAL, A. L.; MENEZES, A. C. L.; FERREIRA, M. S.; SILVA, M. N. P.; ARAÚJO, R. M.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. 2006. Estresse em peixes: respostas integradas para a sobrevivência e a adaptação. In: SILVA-SOUZA, A. T. (Org.). *Sanidade de organismos aquáticos no Brasil*. Maringá: Abrapoa, p. 211-228.

VALENTI, W. C.; POLI, C. R.; PEREIRA, J. A.; BORGHETTI, J. R. 2000. *Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável*. Brasília, DF: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq: Ministério da Ciência e Tecnologia.

VIJAYAN, M. M.; BALLANTYNE, J. S.; LEATHERLAND, J. F. 1991. Cortisol induced changes in some aspects of the intermediary metabolism of *Salvelinus fontinalis*. *Gen. Comp. Endocrinol*., 82:476-486.

WEDEMEYER, G. A. 1997. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Ed.). *Fish stress and health in aquaculture*. United Kingdom: Cambridge University Press, p. 35-71.

WEDEMEYER, G. A.; MCLEAY, D. J. 1981. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In: PICKERING, A. D. (Ed.). *Stress and Fish*. London: Academic Press, p. 247-275.

WENDELAAR BONGA, S. E. 1997. The stress response of fish. *Physiol. Rev*., 77:591-625.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M. A.; MARCON, J. L.; FRAGA, C. G.; BOVERIS, A. 2000. Comparative antioxidant defences in vertebrates – emphasis on fish and mammals. *Trends Comp. Biochem. Physiol*., 7:33-45.
WOODWARD, J. J.; SMITH, L. S. 1985. Exercise training and the stress response in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol*., 26:435-447.

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 9

Anestésicos usados para minimizar strés en peces en la piscicultura

Mónica Pérez-Gianeselli & Carolina Flores-Quintana

Resumen
En acuicultura los anestésicos son usados durante el transporte con el objetivo de prevenir las lesiones físicas y reducir el metabolismo para disminuir el consumo de oxígeno y excreción de metabolitos. Los métodos químicos o físicos utilizados para producir sedación y/o anestesia general o local en animales acuáticos son herramientas necesarias para el manejo de rutina en la piscicultura, e assim seron discutidos nieste capítulo. El anestésico ideal debe asegurar una inducción rápida con mínima hiperactividad, de fácil de administración, ser efectivo a bajas dosis, tener amplio margen de seguridad y brindar una rápida recuperación Es la técnica más utilizada y la velocidad e intensidad de los efectos depende de la concentración de la droga en la solución acuosa. Existe una amplia variedad de agentes anestésicos de variadas características químicas, rango de dosis para diferentes especies de peces. Es de uso indispensable en todas las operaciones de manejo de peces, tales como vacunación, transporte, aplicación de medicamentos, clasificación, muestreo, pesaje. Así mismo, se utilizan los anestésicos para la eutanasia, que deben llevarse a cabo con el mínimo de sufrimiento físico y mental, en situaciones tales como en algunos casos donde será necesario para matar a los animales con humanidad, o terminar un procedimiento experimental.

Abstract
The anesthetics are used in world aquaculture activities, especially for transportation, and then its several uses will be reported and discussed in this chapter. The aim of it is to prevent physical injuries, diminish the metabolism rates leading to lower oxygen consumption and metabolites excretion. The chemical and physical techniques using by to produce sedation and/or general or local anesthesia in aquatics organism are important tools for routine in aquaculture management. The ideal anaesthetics must be safe, harmless with fast induction with minimal

hyperactivity, easy administration and effective in minimal doses, provide a wide security marginal and quickly recovery. This method it is often used and the velocity and intensity of velocity depends from drug concentration in water solution. There are many kinds for chemical anaesthetics with a wide doses range for different type of fish species. It is an essential technique to use in every aquaculture routine operations such as vaccination, transport, medical injection, classification, sampling and weighting activities. Therefore, using anesthetics drugs for other objectives like euthanasia with the goal of diminish physical and mental suffer in situations such as its necessary killed the animals kindly or finished an experimental assay or finish animal painful.

Introduccion

Anestesia proviene del griego *pérdida o disminución de la sensibilidad*. El estado preliminar de la anestesia es la sedación, definida como un efecto calmante, en la cual se induce a la somnolencia, con embotamiento de la percepción sensorial y quizás con algo de analgesia. La anestesia general total puede definirse como una perdida reversible y generalizada de la percepción sensorial acompañada de un estado de sueño similar al fisiológico inducido por drogas o métodos físicos (Ross & Ross, 1999). Involucra un estado de depresión general del SNC que comprende analgesia, hipnosis, supresión de los reflejos y relajación del músculo estriado (Heavner, 1981; Green, 1979).

Los métodos efectivos utilizados para producir anestesia general o local en animales acuáticos van desde la inducción a la hipotermia hasta la administración de químicos por vía inhalatoria, parenteral y oral, y estes serão mostrados e discutidos a seguir.

Mecanismo de la anestesia

La depresión del sistema nervioso central esta dada por acción a nivel de los axones, provocando la liberación de neurotransmisores o aumentando la excitabilidad de la membrana. El principio unificado de la anestesia general es que los anestésicos interactúan con los componentes de la membrana y no con los mecanismos celulares simples (Winlow et al., 1992). En algunos anestésicos existen una relación inversa entre la dosis necesaria para inducir una determinada profundidad de la anestesia y el estado evolutivo del pez.

Estadios de la anestesia

Los estadios de la anestesia descriptos por Mcfarland & Klontz (1969) fueron basados en la observación de los efectos que oscilan entre sedación, anestesia o muerte dependiendo de la combinación de la dosis y el tiempo de exposición. En la práctica algunas especies no cumplen con todos los estadios observados.

A fin de establecer un criterio simple en las fases de la anestesia, se caracterizan tres fases:

a) Fase de Inducción: se registra hiperactividad como respuesta al efecto irritante de la droga. Este periodo puede ser observado en pocos segundos a minutos, dependiendo del anestésico.

b) Fase de Mantenimiento: involucra el estado de sedación y narcosis, donde el pez se mantiene estable. Diferentes factores como tamaño, estadio fisiológico o salud del pez, o bien por modificaciones en la calidad de agua, es recomendable reducir la dosis de la droga, para evitar la fase de parálisis bulbar.
c) Fase de Recuperación: en esta fase el agente anestésico se excreta rápidamente por las branquias y el pez recupera su estado normal, en un periodo que varía de segundos a minutos, debiendo ser una fase rápida y sin efectos colaterales (Tabla 1).

Cada una de las fases varía en la duración de acuerdo a la droga y al método utilizado.

Tabla 1. Estadio, fase y comportamiento en peces con sedacion. Adaptada de Stoskopf (1985).

Estadio	Fase	Comportamiento de los peces
0	Normal	Natación activa. Reacción motora a estímulos externos.
1	Sedacion leve	Leve pérdida de reacción a estímulos visuales y táctiles
	Sedación profunda	Pérdida total de reflejos Movimientos operculares disminuidos. Equilibrio normal
2	Narcosis leve	Fase de excitación precede a aumento de la frecuencia respiratoria. Pérdida parcial del equilibrio. Disminución de la frecuencia respiratoria y tono muscular.
	Narcosis profunda	Pérdida total del equilibrio Disminución marcada del movimiento opercular y tono muscular (*fase adecuada para toma de muestras)*
3	Anestesia leve	Pérdida total del tono muscular (*adecuado para cirugías menores)*
	Anestesia quirurgica	Pérdida total de reacción. Muy baja frecuencia cardiaca y respiratoria
4	Paralisis bulbar	Pérdida total de los movimientos operculares. Fallo cardiorrespiratorio.

Si bien existe un gran dilema acerca de la percepción del dolor en los peces y la magnitud del mismo, la sedación y anestesia son herramientas necesarias para el manejo de rutina en la piscicultura. La manipulación, el transporte prolongado o el manejo en la reproducción constituyen instancias

en las cuales se requiere algún grado de inmovilización y donde es necesario disminuir el estrés. En acuicultura los anestésicos son usados durante el transporte con el objetivo de prevenir las lesiones físicas y reducir el metabolismo con el objeto de bajar el consumo de oxígeno y excreción de metabolitos.

El anestésico ideal debe asegurar una inducción rápida con mínima hiperactividad, de fácil de administración, ser efectivo a bajas dosis, tener amplio margen de seguridad y brindar una rápida recuperación.

El uso de anestésicos durante procedimientos estresantes puede aliviar o retrasar muchas de las reacciones al estrés. La benzocaína reduce a la mitad el consumo de oxígeno durante el manejo (Ross & Ross, 1983), en tanto que el etomidato inhibe la síntesis de cortisol (Pickering, 1993). Sin embargo, la combinación de soluciones anestésicas como MS222 y cloruro de sodio, no fueron efectivas (Harrell, 1992).

Muchos factores biológicos y ambientales afectan la eficacia de los anestésicos, así la dosis efectiva de un anestésico se relaciona con la superficie de las branquias y el peso vivo, los cuales pueden variar considerablemente entre distintas especies de peces. En contraste, han sido reportados que peces de mayor tamaño son mas rápidamente anestesiados que los pequeños. Drogas tales como MS222 o benzocaína son muy liposolubles y en peces de engorde o hembras a punto de desovar, permanecen activos más tiempo y la recuperación es lenta debido a la afinidad del agente hacia la grasa corporal, donde quedan ligados. Otro factor importante que afecta la acción farmacológica de un anestésico es la inmunodepresión, debido a esto los peces son más susceptibles a la intoxicación (Marking & Meyer, 1985).

Los factores ambientales afectan la eficiencia y la eficacia de los agentes anestésicos, así la calidad del agua requiere un monitoreo constante durante la inhalación de los anestésicos, en especial cuando hay una alta densidad de peces y los baños son reutilizados durante un tiempo prolongado. Los problemas que se deben evitar son las variaciones de temperatura, en la concentración de oxígeno disuelto, niveles de amonio y sedimentos sólidos en los baños.

Los peces son poiquilotermos, su temperatura corporal se encuentra en valores similares a la ambiental, por lo tanto, el pasaje físico-químico de la droga absorbida por el pez también estará directamente vinculado con la misma. Así; en ambientes de temperaturas bajas se requieren dosis más altas y mayor tiempo de exposición, debido a la disminución del metabolismo, esto se observó en los agentes anestésicos MS222, benzocaína y 2- fenoxietanol.

El pH de las soluciones anestésicas también influye sobre la eficacia, posiblemente afectando la tasa de intercambio de moléculas, pues al haber variaciones de pH hay mayor porcentaje de la forma ionizada de los fármacos, y no se produce una correcta absorción; este efecto es más pronunciado en la quinaldina, que pierde eficacia en soluciones con bajo pH (Piper et al., 1982).

Los niveles de amonio pueden reducirse por un constante pasaje del agua sobre piedras de zeolita u otro material que intercambie iones y no aumente la toxicidad del baño.

Generalmente, los peces son anestesiados utilizando baños por inmersión, en acuarios que contienen una concentración determinada de un agente anestésico, la absorción del mismo se realiza principalmente por las branquias y la distribución es rápida en el torrente sanguíneo. La anestesia por si misma genera una reacción de estrés que es difícil distinguir de los efectos directos de la captura de los peces previa al baño anestésico. Se observó que en baños con MS222 durante la fase de inducción se produce taquiventilación (aumento de los movimientos operculares) y taquicardia con elevación de la presión arterial (Serfaty et al., 1959; Houston et al., 1971; Randall & Smith, 1967).

Principios básicos de empleo de anestésicos

La ausencia de alimentos en el tubo digestivo facilita la distribución sanguínea del anestésico, disminuye el metabolismo y previene el aumento de sedimentos sólidos en el agua. Este ayuno debe tener un periodo mínimo de 24 horas

Las soluciones anestésicas deben estar adecuadamente tamponadas si el producto lo requiere o por la calidad de agua utilizada. La manipulación de los peces debe realizarse con cuidado para evitar daños en el tegumento, manteniendo las manos del operador siempre húmedas. Para procedimientos de larga duración se utiliza sistemas de recirculación en los acuarios para mantener la provisión de anestésico.

Anestesia por inmersión o inhalatoria

Es la técnica más utilizada, donde la velocidad e intensidad de los efectos depende de la concentración de la droga en la solución acuosa que entra rápidamente a la sangre arterial donde acorta su ruta hacia el sistema nervioso central (Ross et al., 1999). Este sistema sería similar al de la anestesia inhalatoria gaseosa usada en los vertebrados terrestres. La diferencia radica en que la droga y sus metabolitos son excretados por las branquias y en menor cantidad por el tegumento y riñón, como droga inalterada o sus metabolitos. En peces con respiración aérea, este tipo de anestesia es menos efectiva, pues las branquias solo se utilizan para excreción y osmorregulación, por lo tanto, la inducción es muy lenta e impredecible.

En un baño anestésico, los peces son colocados en un recipiente conteniendo el mismo tipo de agua del acuario, adicionado el fármaco y posteriormente se monitorea el comportamiento (Tabla 2). El pez es retirado del agua en el tiempo adecuado, dependiendo del grado de sedación o anestesia que requiera la maniobra a realizar. El estanque de recuperación siempre debe a estar disponible y a poca distancia de los acuarios con anestésicos, así en caso de accidentes por reacción adversa del pez o errores en la dosificación, se puede realizar maniobras inmediatas para la recuperación. Este método es muy bueno para procedimientos que requieren poca duración y donde los peces deben ser manipulados fuera del agua (Stoskopf, 1993).

Anestesia mediante inyección

La aplicación más común es la vía intramuscular (IM) o intraperitoneal (IP) con agujas de 23/2 o 23/4 cm. La técnica es recomendada para peces de gran tamaño, sugiriéndose las agujas 25/8 para peces pequeños Tabla 2. Se considera la viscosidad del agente anestésico que está dada por los excipientes, para seleccionar la aguja adecuada. La vía IP se realiza a nivel de la línea media ventral con la aguja dirigida cráneo-dorsal, alejado del bazo y la IM se realiza en los flancos, por debajo de la línea lateral.

Anestesia Oral

Para esta vía se emplea una sonda para administrar diferentes formas farmacológicas o se administran directamente cápsulas o se mezclan con el alimento. Existen pellets conteniendo diazepam usados con éxito en sábalos americanos, pero con la desventaja de provocar una inducción lenta por la absorción tardía en el intestino (Murai et al., 1979).

Monitoreo de la anestesia y accidente anestésico

El monitoreo es constantemente a través de la observación de los movimientos operculares. Si los animales retornan a un acuario con agua limpia y no se observan movimientos operculares, es necesaria la realización de maniobras para revertir este suceso. Esto consiste en hacer entrar el pez al agua empujando la cabeza primero dentro del agua fresca para que entre agua por la boca y pase a través de las branquias, estimulando de este modo la respiración. Para no aumentar el estrés, el agua no debe entrar a gran velocidad, porque podría dañar los capilares sanguíneos de las laminillas secundarias, obstruyendo el pasaje de oxígeno. Para peces pequeños esta maniobra se reemplaza colocando un tubo en la boca por el cual se vierte directamente agua fresca, hasta observar la recuperación. En ocasiones se observa un cierto reflejo de "tos" durante la recuperación. El signo evidente de recuperación es cuando el pez abre y cierra rápidamente los opérculos con movimientos del cuerpo hacia atrás.

Tabla 2. Agentes anestésicos utilizados en los peces (CCPA, 1998).

Anestésico	Especies	Dosis	Inducción y Recuperación	Comentarios
MS222 (Metansulfonato deTricaína)	Salmónidos Carpa/Gobios Bacalao	25 mg/L 75-100 mg/L 40 mg/L 75 mg/L	Inducción: <3 min Recuperación: <10 min	Utilizar la concentración más alta para una anestesia profunda. Más lenta con temperaturas bajas
Benzocaína hidrocloro	Salmónidos Perca rayada Carpa Bacalao	25-45 mg/L 55-80 mg/L 50-100 mg/L 40 mg/L	Inducción: 2-4 min Recuperación: <10 min	Margen de seguridad muy pequeño entre las dosis eficiente y letal
Lidocaína más 1 g/l $NaHCO_3$	Carpa Tilapia Siluro	350 mg/L 250 mg/L 350 mg/L	Inducción: 1-1.5 min Recuperación:10-13 min	También se puede utilizar exitosamente asociado con CO_2
Etomidato	Salmónidos Gobio amar. Perca rayada Golden Shiners	1,0 mg/L 0,6-2 mg/L 1,0 mg/L 0,5-1,5 mg/L	Inducción: 3-5 min Recuperación: 5-20 min	Más eficiente en aguas alcalinas
Propoxato	Varios	1-4 mg/L	Inducción: 0.5-1 min	Seguro por 16 horas a 0.25 mg/l
Ketamina, hidrocloro	Salmónidos Tiburón	30 mg/kg - IM 10-30 mg/kg- IM	Inducción: 10-300 s Recuperación: 1-2 horas	No bloquea el ritmo respiratorio
2 fenoxietanol	Bacalao Salmónidos	0,1-0,5 ml/L 0,25-0,5 ml/L	Inducción: 2-4 minutos Recuperación: 3-6 minutos	Estrecho margen de seguridad entre las dosis eficiente y letal
Metilpentinol	Trucha	1,5-8 ppt	Inducción: 2-30 minutos Recuperación: 4-60 minutos	Toxico para peces pequeños
	Salmónidos	600-750 mg/L	Inducción: ~3 min Recuperación: 6-20 min	Toxico para peces pequeños. Causa la muerte en todas las concentraciones
Hipotermia	Salmónidos	Inmersión en agua y hielo machacado	Inducción: 10-15 min Recuperación cuando vuelve a su temperatura normal	Peces que viven a 10ºC siguen activos a 1ºC
Halotano	Trucha arco ir	200 mg/L		Letal si duración es >10 minutos
Uretano	Varios	5-40 mg/L	Inducción:2-3 min Recuperación: 10-15 minutos	Cancerígeno conocido
Dietil éter	Varios	10-15 mL/L	Inducción: 2-3 min Recuperación: 5-30 min	Altamente irritante para la piel
Hidrato de Cloral	Varios	0.8-0.9 g/L	Inducción: 8-10 min Recuperación: 20-30 min	No provoca una anestesia profunda, más indicado como sedativo
Propanid	Salmónidos	1.5-3 mL/L	Inducción: 1-4 min Recuperación: 4-10 min	No provoca cambios sanguíneos

Diferentes países tienen aprobados para el uso en peces, distintos agentes anestésicos (Tabla 3).

Tabla 3. Anestésicos aprobados para acuicultura (Schnick et al., 1997).

Anestésicos	Japón	Australia	Canadá	USA
Iso-eugenol (Aquí-S®)	X	X		
Metomidate			X	
Tricaina (MS222®)			X	X

Anestésicos autorizados para uso en peces en Chile.

Anestésicos	Producto Activo
Benzocaina	20%
Iso-eugenol (Aquí-S®)	50%
Tricaina (MS222®)	80%

Fuente: SAG (20/06/2005)

Anestesicos tipo inhalatorios más utilizados

A - MS222 (tricaina metansulfonato)

Es la primera droga desarrollada para lograr sustitutos de la cocaína, inicialmente se utilizó como anestésico local. Es un polvo soluble, que actúa como anestésico y tranquilizante dependiendo del tiempo de exposición y de la concentración en peces, anfibios y otros poiquilotermos acuáticos, presenta acción sedativa o anestésica.

El polvo blanco cristalino se mantiene estable cuando está seco. Posee una cadena de sulfonato que le da características ácidas, pero es 250 veces más soluble en agua que la benzocaína. Se disuelve tanto en agua dulce como salada. El bajo pH de la solución produce irritación en el pez, hematocrito elevado, eritrocitos edematosos, hipoxia, hipercapnia, hiperglucemia, cambios en los electrolitos sanguíneos, niveles hormonales, colesterol, urea, lactato y acido ascórbico interrenal (Ross & Ross, 1999).

Generalmente, se trabaja con solución madre en concentración de 10g/litro que es estable en recipientes oscuros y herméticos. Esta solución permanece efectiva por 3 meses almacenada en ambiente fresco. La solución madre o de trabajo puede ser tamponada con bicarbonato de sodio o solución Tris-bufferada, a un pH de 7,0 a 7,5. La inducción es rápida y puede demandar 15 segundos, en salmónidos es altamente efectiva por inmersión en 50mg/L, aunque el mantenimiento de los efectos puede ser menor a 10mg/L (Laird & Oswald, 1975). Géneros como *Tilapia* y *Clarias*, requieren dosis de 100mg/L (Ross & Geddes, 1979). La recuperación es rápida y el equilibrio y las actividades motoras pueden retornar en pocos minutos. Posee un amplio margen de seguridad Bové (1962). Sin embargo, este margen se reduce cuando la temperatura se eleva y el pez es más pequeño. La droga es más potente en aguas cálidas de baja dureza. No se recomienda la utilización

de agua destilada o deionizada por no poseer poder tampón (Smit et al., 1977). El MS222 es excretado por vía urinaria dentro de las 24 horas y los niveles en tejido caen a cero en el mismo tiempo. El tiempo de resguardo requerido es de 21 días para consumo según la FDA.

Es de uso indispensable en todas las operaciones de manejo de peces, tales como vacunación, transporte, aplicación de medicamentos, clasificación, muestreo, pesaje, etc. En el caso de transporte de peces, el uso de tricaina, disminuye el consumo de oxígeno en los peces sedados, permitiendo acondicionar una mayor cantidad en un volumen de agua determinado. Es indispensable realizar pruebas preliminares para determinar las dosis a utilizar en cada caso en particular, pero en términos generales se pueden usar las siguientes.

Una rápida anestesia para salmones y truchas se logra con concentraciones de droga de 80-120 mg/L, con temperatura del agua de 7–16ºC en tiempos de exposición de 4 a 12 minutos, registrándose la recuperación a los 3 a 15 min.La sedación en las mismas especies con similar temperatura de agua se logra con concentraciones de 15-30 mg/L manteniéndose por 6 hs la sedación. El período de resguardo es de 21 días.

B - Benzocaina (etil-p-aminobenzoato)

Es un material cristalino, químicamente similar al MS222, poco soluble en agua que debe ser primero disuelto en acetona o etanol. La solución madre se prepara en el solvente, generalmente 100 g/L, los cuales se almacenan protegidos de la luz y en envases herméticos, por períodos prolongados. En solución posee pH neutro y probablemente es lo que disminuye la hiperactividad inicial y resulta menos estresante que el MS222. Aunque mucho de los efectos colaterales del MS222 se repiten con la administración de la benzocaína, las consecuencias a largo plazo no parecen afectar la fisiología del pez. Los ensayos por no reportaron disminución del crecimiento ni afectaron la reproducción (Ross et al., 1999).

Ya como anestésico local, la benzocaína actúa bloqueando la conducción nerviosa en todas las fibras, disminuyendo o impidiendo el aumento transitorio de la permeabilidad de la membrana a los iones sodio, produciendo una ligera despolarización de la membrana.

La dosis efectiva varía entre 25 a 50 mg/L, es muy útil en peces de agua dulce, marina y tropical. La inducción demora entre 3 a 5 minutos y la recuperación se registró en 10 minutos en baños de 15 minutos de duración Gilderhus (1989). La tilapia precisa de dosis más elevada que llegan a 100mg/L (Ross & Geddes, 1979). Posee amplio margen de seguridad, sin embargo se reduce en altas temperaturas; la eficacia no es afectada por la dureza o pH del agua. La solución de benzocaína al 20% está indicada en el manejo de peces, en una dosis de 15 a 20 ml por cada 100 litro agua produciendo inmovilización a pocos minutos de la inmersión. Los tiempos de exposición deben controlarse ya que se observan diferentes reacciones según la especie y condiciones de cultivo.

C - Quinaldina (2-4- metilquinolina) y sulfato

La quinaldina es un líquido oleoso amarillento, económico pero muy irritante, con limitada solubilidad en el agua por lo que debe ser disuelta en acetona o alcohol previamente. Las soluciones acuosas pueden tomar color marrón rojizo después de la exposición con el aire. La inducción se realiza en 1 a 4 minutos y la recuperación es generalmente rápida y sin efectos colaterales. Las concentraciones utilizadas para inducción están en el rango de 15 a 60 ppm en truchas-aro-iris (Schoettger & Steucke, 1970; Schramm & Black, 1984).

El sulfato de quinaldina es un polvo amarillo claro soluble que actualmente no se encuentra en el mercado. La quinaldina no es efectiva a un pH 5 o menor y es más potente cuanto más alcalino sea el medio (Ross et al., 1999). Según reporte hecho por Pérez-Gianeselli et al. (2003) acerca del efecto sulfato de quinaldina en juveniles de pacú *Piaractus mesopotamicus*, concluyeron que no altera la calidad del agua sea potable o napa, en concentración de 15mg/L, observándose que en acuarios con agua de napa con quinaldina, el pH se mantuvo sin variaciones significativas, este fenómeno sucedería por un efecto tampón ocasionado por este anestésico. Se reportó su efectividad en larvas de catfish en concentraciones de 35 a 60 mg/ L, con rápida recuperación y sobrevivencia de las larvas (Massee et al., 1995), con resultado similar en reproductores de *Colossoma macropomum,* en una concentración de 15 mg/L (Chepalla et al., 1996).

D - Fenoxietanol

Es una emulsión oleosa de color blanquecino o amarillento, soluble en etanol y cuando se prepara en dosis bajas también es soluble en agua. Posee propiedades antibacterianas y fungicidas, es una droga de bajo costo y la solución de trabajo mantiene su efectividad por un período de 3 días. Es fácil de preparar y práctica para su uso en la piscicultura (Puceát et al., 1989). Posee amplio margen de seguridad, las concentraciones que varían 100 a 200 mg/L son consideradas seguras para una sedación prolongada durante el transporte, dosis de 100 a 600 mg/L brindan sedación leve hasta llegar al plano quirúrgico y en concentraciones de 300 a 400 mg/L se utilizarían para cirugías de corta duración (Ross et al., 1999). La FDA no aprobó para peces destinados a consumo (Shawnet et al., 2004). El 2 fenoxietanol actúa rápidamente cuando la exposición es de corto plazo, con una recuperación rápida y sin efectos colaterales (Idler et al., 1997). En carpa *Cyprinus carpio* fue estudiado por Adamek (1996), Josa et al. (1992) y Mohamed (1999) pero también fue utilizado en otras especies. El 2-fenoxietanol en altas concentraciones induce inmunodepresión, efecto descrito frecuentemente en mamíferos (Kescharek et al., 1994).

La anestesia con 2 fenoxietanol en carpa común *Cyprinus carpio* afecta al contenido plasmático de los cationes (Na, K, Ca, Mg, Cu y Zn), cuyas concentraciones plasmáticas aumentan a medida que la anestesia es más profunda. El incremento se manifiesta a los 5 minutos de la inducción, siendo mayor a medida que se incrementa la dosis. En *Rhamdia quelen*, el efecto de sedación aparece con concentración de 0,30 mL/L y la dosis letal con

0,60mL/L en baños de inmersión por un período de una hora con aireación continua (Pérez-Gianeselli et al., 2007).

E - Metomidato (metoximol)

Droga hipnótica de tipo no barbitúrico, utilizada desde la década de los 80 en otras especies, Matson & Riple (1989) demostraron como la mejor opción para la acuicultura frente a otros agentes anestésicos como benzocaína, MS222 y 2 fenoxietanol, por mayor velocidad de inducción y recuperación que los mencionados anteriormente, pero en el que se observan temblores musculares como efecto colateral. La anestesia en salmónidos y catfish se logra en dosis muy bajas de 5 a 6 mg/L aunque otros ya logran efectos en salmones a concentraciones de 1 a 5 mg/L (Olsen et al., 1995). La droga es más potente en peces adaptados al agua salada que juveniles en agua dulce. Massee et al. (1995) sin embargo destacan alta tasa de mortalidad en larvas a una dosis de 3,0 a 4,5 mg/L.

F - Etomidato

Hipnótico no barbitúrico similar al metomidato, que a dosis mayores de 20 mg/L es efectivo en varias especies de peces (Armend et al., 1982). En *Ictalurus punctatus*, la inducción se presenta en 15 minutos utilizando una dosis de 3mg/L (Limsuwan et al., 1983).

G - Isoeugenol

Anestésico obtenido por destilación de flores, tallos y hojas del clavo de olor (*Eugenia aromatica o caryophyllata*) utilizado en gastronomía y como anestésico tópico en odontología (Curtis, 1990; Soto & Burhanuddin, 1995). Es considerado superior a los anestésicos MS222, benzocaína, 2 fenoxietanol, metomidato (Keene et al., 1998), siendo el único aprobado para la anestesia de los peces en EE.UU. Su bajo costo, la mayor potencia y el amplio margen de seguridad hacen que sea más buscado para usarse en peces que destinados al consumo humano (Miller et al., 1989).

Está clasificado por la FDA como un compuesto seguro (Summerfelt & Smith, 1990) por lo que se alienta para el uso comercial en acuicultura, pudiendo utilizarse en altas concentraciones sin efectos colaterales ni con riesgos de contaminación del medio ambiente. El tiempo prolongado de recuperación es una ventaja en actividades tales como evaluaciones morfológicas, biopsias y maniobras de desove donde el pez debe permanecer por mucho tiempo fuera del agua (Sladky et al., 2001; Rodríguez-Gutierrez & Esquivel-Herrera, 1995). Los estudios comprueban que concentraciones de 2,35 mL/L brindan buena inducción en menos de dos minutos, en comparación con el 2- fenoxietanol que para el mismo efecto requiere dosis de 4mL/L. El período de resguardo desaparece debido a que no se detectan residuos en los tejidos (Kildea et al., 2004). Burka et al. (1997) reportaron que actúa rápidamente sedando los peces hasta que estos puedan ser fácilmente manipulables, disminuyendo el estrés, previniendo el aumento de lactato en los tejidos lo que favorece la calidad de la carne.

Fue evaluado en juveniles de *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata* demostrando su amplio margen de seguridad en concentraciones diez veces menor que la dosis del 2 fenoxietanol (Constantinos et al., 2005). Los estudios *in vitro* indican que existe una interacción con neurotransmisores implicados en la sensación de dolor, efecto agonista sobre el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y antagonista del glutamato, que actúan sobre los receptores N-metil-d-aspartato (NMDA), ambos con gran importancia en la transmisión del dolor (Aoshima & Hamamoto, 1999; Yang et al., 2003).

Farmacos menos utilizados en acuicultura

A - Amobarbital

Barbitúrico muy soluble en agua, efectivo en salmónidos en dosis de 7 a 10 mg/L, la inducción requiere de 30 a 60 minutos y se mantiene por períodos prolongados, la recuperación es lenta, alcanzando las 5 horas. El calcio que se encuentra en altas concentraciones como componente de aguas duras y marinas, antagoniza con este anestésico. No es de uso práctico (Mcfarland & Klontz, 1969; Ross et al., 1999).

B - Hidrato de cloral

Es un compuesto cristalino de olor fuerte e incoloro que es soluble en agua, buen depresor del sistema nervioso central pero de poco efecto analgésico. La anestesia quirúrgica se obtiene a dosis muy altas, el efecto adverso que posee es que deprime la frecuencia respiratoria y cardiaca. La dosis efectiva es en solución al 1%, induciendo muy lentamente a los ciprínidos a los 25 minutos. No es recomendable si el pez debe estar sumergido por más de 10 minutos y la recuperación puede tomar casi 3 horas, como tampoco es recomendable para transporte de largas distancias (Ross et al., 1999).

C - Clorbutanol

Este agente se presenta en forma de cristales que se disuelven fácilmente en agua fría. Las soluciones madres se preparan al 10%, son estables por largos períodos y su dosis efectiva es de 8 a 10 mg/L (Mcfarland & Klontz, 1969). La inducción es rápida, demandando 2 minutos, siendo la recuperación en 30 a 60 minutos. Se puede preparar en una solución al 30% en etanol, donde se adiciona agua a razón de 1ml/L. Es mencionado como muy efectivo para trabajos de rutina en salmón del Atlántico (Nordmo, 1991).

D - Eter (dietil eter)

Es soluble en agua, seguro y efectivo cuando se utiliza una concentración de 10 a 50 mL/L. Potente relajante muscular similar a los curarizantes, es utilizado en gran variedad de peces. La inducción se produce a los 2 o 3 minutos y el tiempo de recuperación varía de 5 a 30 minutos. Se debe tener en cuenta que es altamente inflamable y puede formar compuestos volátiles, es muy peligrosa su manipulación. Se destaca como

agente muy irritante en concentraciones de trabajo (Mcfarland & Klontz, 1969).

E - Propoxato (hidrocloro)

Es un éster de acido carboxílico cristalino, soluble en agua dulce o salada. Forma una solución estable por mucho tiempo; posee grandes propiedades anestésicas, es 100 veces más potente que el MS222 (Thienpont & Niemegeers, 1965). Brinda rápida inducción en 30 a 60 segundos con dosis de 4mg/L. Dosis de 1mg/L son efectivas pero la inducción es lenta, extendiéndosea 5 a 9 minutos. El propoxato posee alto índice terapéutico, pero desafortunadamente la droga es muy cara y probablemente causa alteraciones metabólicas en el pez (Ross et al., 1999).

F - Uretano (etil carbamato)

Es una droga cristalina, soluble en agua y su combinación da una solución neutra. Induce en 2 a 3 minutos, con pocos efectos respiratorios y cardiacos. Posee buen índice terapéutico, es efectivo en una solución de 1 a 5% en *Salmo trutta* (Green, 1979), aunque se sugieren que las dosis efectivas son de 5 a 50 mg/L (Mcfarland & Klontz, 1969). Esta droga fue muy utilizada hasta que se comprobó que produce leucopenia y es carcinogénica tambien (Wood, 1956).

G – Halotano

Es un gas anestésico muy utilizado en medicina humana y veterinaria, actúa sobre el sistema nervioso central bloqueando el pasaje iónico transportador de potasio a través de la membrana celular. En forma pura son líquidos y necesitan ser vaporizados para ejercer su acción (Tabla 2). El punto de ebullición es bajo, 50ºC. Es efectivo en peces, en dosis de 0,5 a 2 mL/L agregado directamente al agua produciendo anestesia, con una rápida inducción, y rápida recuperación (2 a 5 minutos). La desventajas del uso de este gas son el alto costo, la poca solubilidad en agua y la administración es difícil de controlar (Ross et al., 1999).

Anestesicos administrados via parenteral

A - Propanidid

Se trata de un agente anestésico efectivo de corta duración en mamíferos (Clarke & Dundee, 1966). La vía de administración es intraperitoneal y para anestesiar truchas arco iris la dosis efectiva es de 325 mg/Kg y la inducción se observa recién a las 2 horas y media, mucho más tiempo que en los mamíferos. La ventaja es que el centro respiratorio es poco deprimido y la recuperación no presenta reacciones colaterales graves, a pesar de observarse una breve fase atáxica y la recuperación total se completa al cabo de una hora.

B - Ketamina

En truchas-arco-iris y marrón se mantiene por 20 minutos cuando se inyectaba vía intramuscular , en dosis de 130 mg/kg, pero el tiempo de narcosis es de 50 a 80 minutos, durante el cual se notan fases de hiperexcitabilidad y ataxia (Oswald, 1978). Bruecker & Graham (1993) anestesiaron cíclidos con dosis de 30mg/kg via aorta dorsal o vena caudal, produciendo inducción rápida, pero con una considerable reducción de la ventilación después de un minuto. La anestesia terminó en 40 minutos y la recuperación requirió más de 4 horas. El margen de seguridad se reduce con las altas temperaturas. Graham & Iwama (1990) también utilizan ketamina en dosis de 30 mg/kg a *Oncorhynchus mykiss y O. kisutch*.

Otros anestésicos

Lidocaina

Anestésico poco práctico, que demanda 5 minutos de inducción cuando se realiza inyección espinal de 0,1 mL (Oswald, 1978); posteriormente no se presenta sensibilidad en proximidades al sitio de inoculación.

Anestesia metodos físicos

A - Hipotermia

Es efectiva para tranquilizar o inmovilizar a los peces los animales, pero no produce una real analgesia, es eficaz como sedante haciendo el transporte más confortable (Bell, 1964). Aguas a bajas temperaturas reducen la actividad y el consumo de oxígeno del pez, así como el metabolismo y la producción de amonio y residuos sólidos. El enfriamiento se logra agregando hielo o hielo seco en envases térmicos (Solomon & Hawkins, 1981). Si bien se observa inmovilización y reducción de la sensibilidad a la estimulación, se debe recordar que la verdadera anestesia y particularmente la analgesia no es la misma que utilizando un agente químico. La ventaja de esta técnica es que tiene propiedades de sedación y permite manipulación y transporte, cuando se utiliza solo, sin embargo, no es adecuado para trabajos invasivos porque da una verdadera analgesia (Ross et al., 1999).

B - Electroanalgesia

Es una interesante alterativa de los anestésicos químicos, que se realiza con corriente directa o alterna con solenoides sinusoidales, triangulares o cuadrados. Los peces de agua salada en general son menos susceptibles a la electro analgesia, pues el efecto esta muy relacionado con la conductividad del cuerpo y del agua. Al contrario, los peces de agua dulce son mas conductivos que el medio y es más fácil dirigir los electrones a través del pez. Provee una aparente sedación y anestesia a corto plazo (Ross et al., 1999).

Efectos de los anestésicos sobre los parámetros sanguíneos

Los cambios en los parámetros sanguíneos relacionados con el estrés se producen cuando el pez es manipulado en los primeros minutos e incluye alteraciones en las hormonas plasmáticas, metabolismo y balance electrolítico (Mazeaud & Mazeaud, 1981; Acerate et al., 2004). Los peces responden a las amenazas con altos niveles de catecolaminas a nivel plasmático (Barton & Iwama, 1991), mencionado como efecto primario que desencadena la respuesta secundaria relacionada con los requerimientos energéticos, que incluyen el aumento de la glucemia (Carmichael et al., 1984).

El pez anestesiado atenúa los cambios bioquímicos y fisiológicos debidos al estrés, pero sucede que los mismos agentes químicos pueden inducir efectos indeseables, los cuales son también reflejados en los parámetros bioquímicos. El análisis de los índices sanguíneos es útil para la evaluación y vigilancia de las condiciones de organismos acuáticos (Velíšek et al., 2009). Estudios realizados en *Perca fluviatilis* sometidas a varios anestésicos, como MS222, eugenol, 2-Fenoxietanol y propiscin (mezcla de etomidato y un imidazol) destacan el aumento de la glucemia, y además, se encuentran niveles altos de amonio en peces tratados con MS222. El rápido aumento de la glucemia es una respuesta a la liberación de catecolaminas, las cuales se incrementan, presumiblemente como reflejo de la hipoxia causada por la disnea, en el plasma del pez anestesiado. Holloway et al. (2004); Velíšek et al. (2005) también notaron el aumento en la glucemia en trucha-arco-iris provocado por la anestesia con eugenol más Ortuno et al. (2002) lo reportaron con 2 - fenoxietanol en *Sparus aurata*.

Elevados niveles de amonio en sangre indican aumento en el catabolismo de las proteínas o algunos desequilibrios en la remoción del amonio (Svoboda, 2001) pero diferentes autores no han encontrado datos significativos con ningún agente anestésico en particular.

La actividad de las enzimas en el plasma sanguíneo sirve como indicadora de estrés, principales lacticodeshidrogenasa (LDH), creatinquinasa (CK), alanita-aminotransferasa (ALT) y aspartato-transaminasa (AST), donde el aumento en la actividad indica daño tisular. En el unico que se observó aumento de CK es en el tratamiento con 2 fenoxietanol reportado por Velíšek et al. (2009).

Con 2 fenoxietanol se reportan aumentos LDH y fosfatasa alcalina (ALP), la actividad de la LDH indica cambios metabólicos por ejemplo el catabolismo del glucógeno produciendo mucho lactato en el pez estresado**.** La presencia de fosforo inorgánico aumentado con el 2 fenoxietanol en la perca no concuerda con los encontrados en otras especies como trucha arco iris, carpa común y catfish europeo (Velíšek & Svobodova, 2004; Velíšek et al., 2007). Altas concentraciones de amonio pueden estar ligadas a la redistribución de electrolitos entre los compartimentos de los medios intracelular y extracelular y /o disfunción renal.

Efectos de los anestésicos sobre la respiración

El aumento del lactato en sangre sucede cuando hay insuficiente cantidad de oxígeno disponible para el metabolismo celular aeróbico, que

podría deberse a la reducida ventilación y circulación, ambos efectos colaterales comunes al uso de muchos anestésicos (Houston et al., 1971; Iwama et al., 1989). Se ha demostrado que la benzocaína y el eugenol causan reducción de la ventilación branquial debido a la depresión de los centros respiratorios medulares, con la consecuente hipoxia (Keene et al., 1998). La hipoxia es más intensa cuando se acompañada de bradicardia y disminución del flujo sanguíneo a través de las branquias (Mattson & Ripple, 1989).

Efectos de los anestésicos sobre la inmunidad y sobrepoblacion

Existe poca información relacionada con la anestesia y el sistema inmune de los peces. En los peces hay receptores químicamente parecidos a la lectina que juegan un importante rol en la función fagocítica, que permiten la interacción entre la anestesia y la inhibición de la función fagocítica, facilitando la interacción entre el antígeno y la superficie del fagocito (Secombes, 1996). Un suceso similar puede ocurrir durante la anestesia profunda pero no durante la sedación del pez. Como acción aditiva, la dosis sedante del anestésico parece proteger la función fagocítica contra la depresión causada por la alta densidad de la población. Ortuno et al. (2002) realizaron estudios acerca de la inmunodepresión causada por el uso de una agente anestésico en peces. Observaron los efectos secundarios del 2 fenoxietanol en alta densidad poblacional de *S. auratus*. La dosis sedante induce al aumento de cortisol pero siempre en niveles más bajos que el provocado por el aumento de la densidad. En alta densidad de peces, la dosis sedante parece minimizar el aumento de los niveles de cortisol provocados por el hacinamiento (Iwama et al., 1989).

El complemento y la actividad fagocítica son indicadores adecuados de la inmunidad muy utilizados en estudios de estrés en peces (Scott & Klesius, 1981; Yin et al., 1995; Tort et al., 1996; Ortuno et al., 2002). Se destaca que la actividad sérica del complemento está deprimida por el estrés de la alta densidad de población y por la administración del 2 fenoxietanol.

Eutanasia

El procedimiento de eutanasia debe llevarse a cabo con el mínimo de sufrimiento físico y mental. Será necesario para sacrificar a los animales, terminar un procedimiento experimental o para aliviar la agonía, recurriéndose a sobredosis de cualquier agente anestésico.

Comentarios finales

El uso de los anestésicos en piscicultura esta evolucionando hacia el encuentro de un agente químico ideal de fácil preparación, bajo costo y con poco efecto colateral en la salud del pez, que no constituya otro factor estresante agregado al de manipulación. También deberá ser seguro para el consumo, con el mínimo de residuos de la droga en la carne.

El baño por inmersión con agentes anestésicos constituye el método más efectivo y será la selección del fármaco la que defina los requisitos mencionados anteriormente.

Referencias

ACERATE, L.; BALASCH, J. C.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; TORT, L. 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis L)* subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture*, 237:167- 178.

AMEND, D. F.; GOVEN, B. A.; ELLIOT, D. G. 1982. Etomidate: effective dosages for a new fish anesthetic. *Trans. Amer. Fish. Soc*., 111:337-341.

AOSHIMA, H.; HAMAMOTO, K. 1999. Potentiation of GABA A receptors expressed in *Xenopus oocytes* by perfumes and phytoncid. *Biosc. Biotech. Bioch*., 63:743-748.

BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish. Dis*., 1:3-26.

BELL, G.; BLACKBURN, J. 1984. Anesthetizing chinook smolts. In: ALDERICE, D. F.; WOOD, F. E. A.; NARVER, W. (Ed.). *Salmonid Enhancement Program — Preliminary Notes on New Information in Salmonid Hatchery Propagation*. [S.l.]: Canadian Data Report of Fisheries and Aquatic Sciences, No. 496,

BOVÉ, F. J. 1962. MS222 Sandoz. The anaesthetics and tranquiliser for fish, frogs and other cold-blooded organisms. *Sandoz News, Baske*, 13:24.

BROWN, L. 1987. Recirculation anaesthesia for laboratory fish. *Lab. Anim*., 21:210-215.

BRUECKER, P.; GRAHAM, M. 1993. The effects of the anesthetic ketamine hydrochloride on oxygen consumption rates and behavior in the fish Heros (*Cichlasoma) citrinellum* (Günther, 1864). *Comp. Biochem. Physiol*., 104C:57-59.

BURKA, J. F.; HAMMELL, K. L.; HORSBERG, T. E.; JONSON, G. R.; RAINNIE, D. J.; SPEARE, D. J. 1997.Drugs in salmonid aquaculture. *J. Vet. Pharmacol. Ther*., 20:333-349.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE - CCPA. 1998. Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación. Ottawa, Capitulo XII – Eutanasia. Disponível em: http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GUIDES/SPANISH/V1_93/CHAP/CHXII.HTM.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE - CCPA. 1984. Vertebrados silvestres en el campo y en laboratorio. Ottawa, Capítulo 2.2, Volumen 2

CARMICHAEL, F. J. 1985. General anaesthetics and local anaesthetics. In: KOALNT, H.; ROSCHLAU, W. H. E.; SELLERS, M. (Ed.). *Principles of Medical Pharmacology*. Toronto: University of Toronto, p. 265-289.

CARMICHAEL, G. J.; TOMASSO, J. R.; SIMCO, B. A.; DAVIS, K. B. Confinament and water quality-induced stress in largemouth bass. *Trans. Amer. Fish. Soc*., 113: 767-777, 1984.

CLARKE, R. S. J.; DUNDEE, J. W. 1978. Survey of experimental and clinical pharmacology of propanidid. Anaesthesia and Analgesia. *Current Res*., 45:250-276.

CONSTANTINOS, C. M.; CARDINALETTI, G.; SIGELAKI, I.; POLZONETTI-MAGNI, A. 2005. Comparative efficacy of clove oil and 2- Phenoxyethanol as anaesthetics in the aquaculture of European sea brass (*Dicentrarchus labrax)* and gilthead sea bream (*Spaurus aurata)* at different temperatures. *Aquaculture*, 246(1):467-481.

CURTIS, E. K. 1990. In pursuit of palliation: oil of cloves in the arto f dentistry. *Bull. Hist. Dent*., 38:9-14.

CHEPALLA, S.; CACHO, M.; HUNTINGFORD, F.; BEVERIDGE, M. 1996. Observations on induced breeding of the Amazonian fish tambaqui, *Colossoma macropomum* using CPE and HCG treatments. *Aquacul. Res*., 27: 91-94.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2007. *Fish Stats Plus*: universal software for fishery statistical time series: version 2.32. Rome, Italy.

FESCHAREK, R.; FRANKE, V.; SAMUEL, M. R. 1994. Do anaesthetics and surgical stress increase the risk of post-exposure rabies treatment failure? *Vaccine*, 12:12-13.

GILDERHUS, P. A. 1989. Efficacy of benzocaine as an anesthetic for salmonid fishes. *North Amer. J. Fish. Manag*., 9(2):150-153.

GRAHAM M.; IWAMA G. K. 1990. The Physiologic effects of the anesthetic ketamine hydrochloride on two salmonid species. *Aquaculture*, 90:323-331.

GREEN, C. J. 1979. *Animal Anaesthesia*. London, Laboratory Animal Handbook, 300 p.

HARRELL, R. M. 1992 Stress mitigation by use of salt and anaesthetic for wild stripped bass captured from broodstosk. *Prog. Fish Cult*., 54(4):228-233.

HEAVNER, J. E. 1981. Animal models and methods in anaesthesia research- In: WILLIAM, I. G. *Methods in animal experimentation*. New York: Academic Press, 469 p.

HOLLOWAY, A. C.; KEENE, J. L. NOAKES, D. G.; MOCCIA, R. D. 2004. Effects of clove oil and MS222 on blood hormone profiles in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss Walbaum. Aquacult. Res*., 35:1025-1030.

HOUSTON, A. H.; CZERWINSKI, C. L.; WOODS, R. J. 1971. Cardiovascular and respiratory activity during recovery from anaesthesia and surgery in brook trout *Salvelinus fontinalis* and carp *Cyprinus carpio J. Fish. Res. Bd. Can*., 30:1705-1712.

HOUSTON, A. H.; MADDEN, J. A.; WOODS, R. J.; MILES, H. M. 1971. Some physiological effects of handling and tricaíne methane sulphonate anasthetization upon the Brook Trout, *Salvelunis fontalis. J. Fish. Res. Bd. Can*., 28(5):625-633.

IDLER, D. R.; MCBRIDE, J. R.; JONAS, R. E. E.; TOMLOINSON, N. 1961. Olfactory perception in migrating salmon. II. Studies on a laboratory bioassay for homestream water and mammalian repellent. *Can. J. Biochem. Physiol*., 39:1575-1584.

IWAMA, G. K.; MCGEER, J. C.; PAWLUL, M. P. 1989. The effects of five fish anaesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. *Can. J. Zool*., 67:2065-2073.

JOSA, A.; ESPINOZA, E.; CRUZ, J. J.; GIL, I.; FALCETO, M. V.; LOZANO, R. 1992. Use of 2- phenoxyethanol as an anaesthetic agent in goldfish *Cyprinus carpio*. *Vet. Rec*., 131:468-469.

KEENE, J. L.; NOAKES, D. L. G.; MOCCIA, R. D.; SOTO, C. G. 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquacul. Res*., 29:89-101.

KILDEA, M. A.; ALLAN, G. A.; KEARNEY R. E. 2004. Accumulation and clearance of the anaesthetics clove oil and AQUI-S ™ from the edible tissue of silver perch *Bidyanus bidyanus*. *Aquaculture*, 2132:265-277.

LAIRD, L. M.; OSWALD, R. L. 1975. A note on the use of benzocaíne (ethyl-p-aminobenzoate) as a fish anaesthetic. *J. Inst. Fish. Manag*., 6(4):92-94.

LIMSUWAN, C.; GRIZZLE, J. M.; PLUMB J. A. 1983. Etomidate as an anesthetic for fish - its toxicity and efficacy. *Trans. Amer. Fish. Soc*., 112 (4):544-550.

MARKING, L. L.; MEYER, F. P. 1985. Are better anesthetics meed in fisheries?. *Fisheries*, 10(6):2-5.

MASSEE, K. C.; RUST, M. B.; HADY, R. W.; STICKNEY, R. R. 1995. The effectiveness of tricaine, quinaldine sulphate and metomidate as anaesthetics for larval fish. *Aquaculture*, 134(3-4):351-360.

MATTSON, N. S.; RIPLE, T. H. 1989. Metomidate, a better anesthetic for cod *Gadus marhua* in comparision with benzocaíne, MS222, chlorobutanol and phenoxyethanol. *Aquaculture*, 83:89-94.

MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, E. 1981. Adrenergic responses to stress in fish. In: PICKERING, A. D. (Ed.). *Stress and fish*. New York: Academic Press, p. 49-75.

McFARLAND, W. N.; KLONTZ, G. W. 1969. TÍTULO. *Anesth. Fishes*, 28(4):1535-1549.

MURAI, T.; ANDREWS, N. W.; MULLER, J. W. 1979. Fingerling American shad: effect of valium, MS222 and sodium chloride on handling mortality. *Prog. Fish Cult*., 41:27-29.

NORDMO, P. 1991. Salmon farming in Norway. In: BROWN, L. *Aquaculture for veterinarians*. Oxford: Pergamon Press.

OLSEN Y. A.; EINARSDOTTIR I. E.; NILSSEN K. J. 1995. Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon, *Salmo salar*, prevents plasma cortisol increase during stress. *Aquaculture*, 134(1-2):155-168.

ORTUNO, J.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. 2002. Effects of tour anaesthetics on the innate immune response of gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Fish Shellfish Immunol*., 12:49-59.

OSWALD, R. L. 1978. Injection anaesthesia for experimental studies in fish. *Comp. Bioch. Physiol*., 60:19-26.

PEREZ-GIANESELLI, M. R.; LONGONI DE MEABE, C.; DOMITROVIC, H. A. 2003. Evaluación del efecto del anestésico sulfato de quinaldina en pacú (*Piaractus mesopotamicus*) en relación con diferentes calidades de agua durante el transporte. In: SESIONES DE COMUNICACIONES CIENTÍFICAS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS, 24., 2003, Corrientes, Argentina. *[Anais...]* [S.l.: s.n.].

PÉREZ-GIANESELLI, M. R.; HERNÁNDEZ, D. R.; FLORES-QUINTANA, C. I.; DOMITROVIC, H. A. 2007. Determinación de niveles letales y anestésicos del MS222 y 2- fenoxietanol en Rhamdia quelen. In: SESIONES DE COMUNICACIONES CIENTÍFICAS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS, 26., 2007, Corrientes, Argentina. *[Anais...]* [S.l.: s.n.].

PICKERING, A. D. 1993. *Husbandry and stress*. Oxford: Blackwell Science, 340 p.

PIPER, R. G.; MCELWAIN, I. B.; ORME, L. E.; MCCRAREN, J. P.; FOWLER, L. G.; LEONARD, J. 1982. *Dish Hatchery Management*. Washington DC.: Fish and Wildlife Service.

PIRHONEN, J.; SCHRECK, C. B. 2003. Effects of anaesthesia with MS222, clove oil and CO_2 on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss). Aquaculture*, 220:507-514.

PUCÉAT, M.; GARÍN, D.; FRÉMINET, A. 1989. Inhibitory effect of anaesthesia with 2 – phenoxyethanol as compared to MS222 on glucose release in isolated hepatocytes from rainbow trout *Salmo gairdneri. Comp. Biochem. Physiol*., 94:221-224.

RANDALL, D. J.; SMITH, L. S. 1967. The effect of environmental factors on circulation and respiration in teleost fish. *Hydrobiología*, 29:113-124.

RODRÍGUEZ-GUTIERREZ, M.; ESQUIVEL-HERRERA, A. 1995. Evaluation of the repetead use of xylocaíne as anesthetic for the handling of breeding carp *Cyprinus carpio. Aquaculture*, 129:431-436.

ROSS, L. G.; GEDDES, J. A. 1979. Sedation of warm-water fish species in aquaculture research. *Aquaculture*, 16:183-186.

ROSS, B.; ROSS, L. G. 1983. The oxigen requirements of *Oreochromis niloticus* under adverse conditions. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA IN AQUACULTURE, 1., 1983, Nazareth, Israel. *Proceedings...* Nazareth, p. 134-143.

ROSS, L. G.; ROSS, B. 1999. *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. 2. ed. [London]: Blackwell Science Editors, 160 p.

ROUBACH, R.; GOMES, L. C.; FONSECA, E. A. L.; VAL, A. L. 2005. Eugenol as na efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquacul. Res*., 36:1056-1061.

SCHNICK, R. A., ALDERMAN, D. J., ARMSTRONG, R., GOUVELLO, R. L., ISHIHARA, S., LACIERDA, E. C., PERCIVAL, S.; ROTH, M. 1997. Worldwide aquaculture drug and vaccine registration progress. In: *Workshop at the EAFP Eighth International Conference on Diseases of Fosh and Shellfish, Edinburgh, Scotland, September 14–19*.

SCHOETTGER, R. A.; STEUCKE, E. W. 1970. Synergic mixtures of MS22 and quinaldine as anaesthetics for rainbow trout and northern pike. *Prog. Fish Cult*., 32:202-205.

SCHRAMM, H. L.; BLACK, D. J. 1984. Anaesthesia and surgical procedures for implanting radio transmitters into grass carp. *Prog. Fish Cult*., 32:202-205.

SCOTT, A.; KLESIUS, P. H. 1981. Chemiluminescence: a novel analysis of phagocytosis in fish. In: ANDERSON, D. P.; HENNESSEN, W. (Ed.). *Developments in Biological Standararddization*. Karger: Basel, p. 243-256.

SECOMBES, C. J. 1996. The innate immune system: cellular defences. In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. (Ed.). *The Fish Immune System*. San Diego, CA: Academic Press, p. 63-103.

SERFATY, A.; LAVAT, R.; QUILLER, R. 1959. Les reactions cardiaques chez la carpe (*Cyprinius carpio*) au cours d`une anasthesie prolongee. *Hydrobiologia*, 13:134-151.

SLADKY , K. K.; SWANSON, C. R.; STOSKOPF, M. K.; LOOMIS, M. R.; LEWBART, G. A. 2001. Comparative efficacy of tricaíne methanesulfonate and clove oil for use as anesthetic in red pacu *Piaractus brachypomus. Am. J. Vet. Res*., 62:337-342.

SMIT, G. L.; SCHOONBEE, H. J.; BARHAM, W. T. L. 1977. Some effects of the anaesthetic MS222 on freshwater bream. *South African J. Sci*., 73(11):351-352.

SOLOMON, D. J.; HAWKINS, A. D. 1981. Fish capture and transport. In: HAWKINS, A. D. *Aquarium Systems*. London: Academic press.

SOTO C. G.; BURHANUDDIN, C. G. 1995. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring *length* and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture*, 136(1-2):149-152.

STOSKOPF, M. 1993. *Fish Medicine*. [S.l.]: Editor Saunders.

STOSKOPF, M. K. 1985. *Manual for aquatic*. Workshop American Association for Lab Animal Science. National Capital Area Branch. Washington, DC.

SUMMERFELT, R. C.; SMITH, L. S. 1990. Anaesthesia, surgery and related techniques. In: SCHRECK, C. B.; MOYLE, P. B. (Ed.). *Methods for fish biology*. Bethesda, MD: American Fisheries Society, p. 213-272.

SVOBODA, M. 2001. *Stress in fish-review*. Czech. Republic, 31 p. (Bulletin Research Institute if Fish Culture and Hydrobiology).

THOMAS, P.; ROBERTSON, L. 1991. Plasma cortical and glucose stress responses of red drum *Sciaenops ocellatus* to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS222, quinaldine sulphate and metomidate. *Aquaculture*, 96:69-86.

THIENPONT, D.; NIEMEGEERS, C. H. J. E. 1965. Propoxate (R7464): a new potent anaesthetic agent in cold –blooded vertebrates. *Nature*, 205:1018-1019.

TORT, L.; GÓMEZ, E.; MONTERO, D.; SUNYER, J. O. 1996. Ferum haemolytic and agglutinating activity as indicators of fish immunocompetence: their suitability in stress and dietary studies. *Aquacul. Int*., 4:31-41.

VELÍŠEK, J.; SVOBODOVA, Z. 2004. Anaesthesia of common carp (*Cyprinus carpio L)* with 2 –phenoxyethanol: acute toxicity and effects on biochemical blood profile. *Acta Veterinaria Brno*, 73:378-384.

VELÍŠEK, J.; SVOBODOVA, Z.; PIAČKOVÁ, V. 2005. Effects of clove oil on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Veterinaria BRNO*, 74:139-146.

VELÍŠEK, J.; VLASTIMIL, S.; KOURIL, J. P.; SVOBODOVA, Z. 2009. Comparision of the effects of four anaesthetics on biochemical blood profiles of perch. *Aquacul. Res*., 40:354-364.

VELÍŠEK, J.; WASLOW, T.; GOMULKO, P.; SVOBODOVA, Z.; NOVOTNỳ, L. 2007. Effects of 2 –phenoxyethanol anaesthesia on sheat fish (*Silurus glanis L)*. *Vet. Med*., 52:103- 110.

WENDELAAR BONGA, S. E. 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev*., 77:591-625.

WINLOW, W.; YAR, T.; SPENCER, G.; GIRDLESTONE, D.; HANCOX, J. 1992. Differential effects of general anaesthetic on identified molluscan neurons in situ and in culture. *Gen.Pharmacol.*, 23:985-992.

WOODS, E. M. 1956. Urethane as a carcinogen. *Prog. Fish Cult*., 18:135.

YIN, Z.; LAM, T. J.; SIN, Y. M. 1995. The effects of crowding stress on the non-specific immune response in fancy carp (*Cyprinus carpioL*.). *Fish Shellfish Immunol.*, 5:519-529.

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 10

Adaptações bioquímicas à natação sustentada em peixes com alto potencial para piscicultura

Gilberto Moraes, Araceli Hackbarth, Gustavo A. Arbeláez-Rojas, Fernando Fabrizzi & Cleujosí da Silva Nunes

Resumo
A aquicultura é uma atividade que está em pleno desenvolvimento, expandindo-se e intensificando-se em muitos lugares do mundo. Entretanto, para atender esta demanda, densidades de estocagem cada vez mais altas são utilizadas nos sistemas intensivos de criação, e isto pode acarretar alterações nas funções fisiológicas e bioquímicas dos peixes, além de alterar seu bem-estar. Diante disto, se faz necessário introduzir novas formas de manejo e inovações tecnológicas que possam ser adaptadas e inseridas nos diferentes sistemas de produção de peixes de interesse comercial. O exercício aeróbico sustentado em peixes surge como uma alternativa viável e promissora, pois pode melhorar o bem-estar dos peixes, aumentar sua produção e sua sobrevivência nos sistemas de criação. Na natureza, os peixes estão constantemente em atividade, nadando ou não contra corrente em velocidades e tempos variáveis; velocidades extenuantes de natação são eventos pouco vivenciados pelos peixes, os quais podem resultar em distúrbios metabólicos significativos e afetar o crescimento. Entretanto, quando os peixes nadam em velocidades moderadas por longos períodos o seu crescimento é beneficiado, resultando em melhores taxas de conversão alimentar. Nesta condição, a natação sustentada é mantida pelo metabolismo aeróbico, sem resultar em fadiga muscular. Em condições de cativeiro, é possível simular o que acontece na natureza e, sobretudo, beneficiar o crescimento dos peixes. Para isso, basta submetê-los a programas de treinamento de natação dentro de uma faixa de velocidade apropriada para cada espécie. Matrinxã, Brycon amazonicus e pacu, Piaractus mesopotamicus, que são espécies de piracema, têm apresentado ótimos resultados de desempenho e melhor perfil metabólico, decorrente do exercício de natação sustentada, do que aqueles criados em sistema convencional. Também se sabe que o exercício estimula maior densidade

energética nos músculos e no fígado, o que permite maior tolerância a fatores ambientais de estresse e subsequentemente, maior resistência a doenças. Por isso, peixes criados em sistemas onde o exercício é induzido podem apresentar melhores qualidades comerciais, e por esta razão, esta técnica deveria receber atenção especial de pesquisadores e piscicultores.

Abstract

Fish culture is a current activity in frank development expanding all over the world. However, to respond to such growing demand increasing fish stock densities have been used in intensive fish culture farms. This practice should result in physiological and biochemical alterations in addition to declining the fish welfare. In consequence, it is necessary new handling and technological procedures potentially adaptable to be used in several systems of fish farming. Aerobic sustained swimming rises as promising and liable alternative able to enhance the fish welfare, increase biomass production and augment survive ratios. In the wild, fish are in permanent activity occasionally swimming against stream at different speeds and spans. Wearisome swimming speeds are uncommon events during the fishes' life. These actions may result in metabolic disturbances whish should affect fish growth rate. However, when fishes swim for long periods at moderate speeds (sustained swimming) their growth is enhanced resulting in better feeding conversion rates. In such condition sustained swimming is kept by aerobic metabolism without muscular fatigue. In captivity it is possible to emulate wild and overall to enhance the animal growth. For such, it is enough to submit fish to training programs into a swimming speed range proper to the species. Matrinxã Brycon amazonicus and pacu Piaractus mesopotamicus are migratory species and, as reared in sustained swimming conditions, have presented better performance and metabolic profile than fish reared in conventional systems. Moreover, is well known that exercise stimulate higher concentrations of energetic substances in muscle and liver. This fact allows more tolerance to cope with stress and then more resistance against diseases. Therefore, fish reared under sustained swimming can present better commercial traits which encourage the use of this practice either by researchers or by fish farmers.

Introdução

A habilidade natural de nado entre os peixes pode trazer vantagens no desempenho e na produtividade se bem explorada em sistemas de cultivo. A exploração desta habilidade natural faz-se através de sistemas de exercício durante a criação e o desenvolvimento dos peixes. Esses sistemas apresentam reflexos no estado fisiológico e conseqüentemente nas condições de saúde dos animais. Todavia, inúmeros aspectos concernentes ao exercício em peixes merecem ainda especial atenção, particularmente em condições de criação intensiva. Espécies muito ativas em seu habitat natural necessitariam exercitar-se, mesmo em sistemas de cultivo. Entretanto, mesmo em exercício, fatores tais como a forma de criação, o adensamento, o manejo, o arraçoamento, a composição das dietas, entre outros fatores de igual importância, podem reduzir o desempenho dos animais. Os resultados de desempenho obtidos na criação de peixes podem e devem ser vistos em

última análise como função de adaptações fisiológico-bioquímicas que, se bem exploradas, podem aumentar o rendimento na atividade produtora de criação.

Apesar de os peixes serem, até certo ponto, similares aos animais terrestres em suas bases bioquímicas, eles apresentam algumas adaptações especiais que lhes permitem viver nos mais variados ecossistemas aquáticos. Entre estes processos adaptativos, a ontogenia, os processos respiratórios, a osmorregulação, a excreção de subprodutos nitrogenados, a alimentação e a digestão, são conceitos importantes a serem entendidos para posterior aplicação no gerenciamento das diversas condições de criação. Somente dessa forma pode-se manter a homeostase dos animais, bem como aprimorar suas técnicas de criação.

Sabemos que as diferentes formas de exercício com potencial aplicação na criação de peixes promovem, entre outras, uma variedade de respostas fisiológicas, metabólicas, de crescimento e de comportamento. Estas respostas, decorrentes da atividade física, podem ser medidas através de parâmetros de comportamento, de desempenho e até mesmo de respostas metabólicas, as quais incluem as mudanças na capacidade de utilização de substratos energéticos da ração, tais como: carboidratos, proteínas e lipídios. Para que esses resultados sejam obtidos de forma interessante algumas perguntas devem ser respondidas *a priori*. Entre elas: Quais seriam os efeitos da intensidade do exercício sobre os peixes? Quais os efeitos da duração do exercício de natação? Como o exercício altera o crescimento, o metabolismo, o comportamento e a sobrevivência das diferentes espécies? Sabe-se que, em decorrência da intensidade e duração do treinamento de natação, surgem adaptações fisiológicas e bioquímicas que podem levar à melhora no desempenho e garantir ainda maior sucesso nos sistemas de criação. Portanto, conhecer as respostas bioquímico-fisiológicas dos peixes à realização de exercício é fundamental para a compreensão dos processos que governam seu crescimento e sua aplicabilidade nos diferentes sistemas de criação, permitindo assim melhorar as práticas de manejo e o bem-estar dos animais.

O Exercício

Nos peixes, o ato de nadar compreende um sistema complexo de movimentos com os quais eles realizam numerosas atividades relacionadas à sua sobrevivência em diversos habitats (Evans, 1993). A velocidade com que eles se exercitam é muito importante, já que a intensidade desta atividade determina sua duração. Fatores relacionados à alimentação levaram os peixes ao desenvolvimento de adaptações morfológicas e funcionais específicas dos tipos de natação. A intensidade de nado em alta velocidade é sustentada por curtos períodos e os peixes entram em fadiga rapidamente, levando a mudanças metabólicas que podem comprometer seu crescimento. Diferentemente, velocidades baixas ou moderadas podem ser sustentadas por grande período trazendo benefícios, como: maior crescimento, taxas de conversão alimentar eficientes e diminuição do comportamento agressivo (Taylor et al., 1995; Davison, 1997; Holk & Lykkeboe, 1998; Azuma et al., 2002; Bugeon et al., 2003).

A velocidade crítica de natação (U_{crit}) é o parâmetro ideal para se determinar a velocidade máxima que um peixe pode sustentar até que ele apresente fadiga. A partir deste valor podem-se categorizar os diferentes tipos de exercício (Brett,1964 apud Richards et al., 2002). Basicamente, este protocolo consiste em colocar os peixes em tanques próprios, denominados túneis de natação, onde são submetidos à natação contracorrente, se aumentando a velocidade de 5-10 cm/seg a intervalos de tempo pré-determinados ou, até que ocorra a fadiga. O momento em que o peixe perde a posição de nado (equilíbrio) por três vezes seguidas, após ter sido reintroduzido na correnteza, é definido como fadiga e é o ponto onde ele atinge sua velocidade máxima (Jobling, 1994; Richards et al., 2002). A velocidade é expressa em cm/seg, ou então, em CC/sec (comprimento corporal/segundo).

A atividade natatória nos peixes possui uma classificação que não indica apenas o tempo e a intensidade do exercício, mas também mostra qual o dispêndio respiratório e os caminhos metabólicos empregados para atender a demanda energética imposta a cada tipo de exercício. A atividade muscular também é diferenciada dependendo da velocidade de natação. Estas atividades podem ser classificadas segundo Jobling (1994) e Holk & Lykkeboe (1998) em: exercício aeróbico, exercício prolongado e exercício explosivo.

A - Exercício explosivo ou de exaustão

Neste tipo de exercício o peixe é forçado a nadar contra velocidades bastante altas, resultando rapidamente em fadiga (Jobling, 1994; Taylor et al., 1995). O exercício não ultrapassa 20 segundos e o metabolismo energético é suprido preferencialmente pelo metabolismo anaeróbico. Os peixes podem sofrer grandes distúrbios metabólicos, inclusive apresentar taxas de crescimento diminuídas. As fibras musculares recrutadas nesse tipo de exercício são as vermelhas (oxidativas), inicialmente, sendo substituídas logo em seguida pelas fibras brancas (glicolíticas) (Lackner et al., 1988; Moyes & West, 1995; Taylor et al., 1995; Milligan, 1996; Richards et al., 2002). Como o metabolismo anaeróbico é muito menos eficiente que o aeróbico, o oxigênio é rapidamente utilizado levando a cessação da atividade natatória. Além destas modificações, a atividade extenuante promove decréscimo do pH sanguíneo e profundos distúrbios hidroeletrolíticos (Wood, 1991; Postlethwaite & Mcdonald, 1995; Holk & Lykkeboe, 1998). Os efeitos metabólicos decorrentes dos exercícios de alta intensidade – prolongado e explosivo – são mais conhecidos do que os de longa duração (Wood, 1991; Milligan & Girard, 1993; Young & Cech Junior, 1994a; Weber & Haman, 1996; Davison, 1997; Richards et al., 2002), todavia são eventos pouco vivenciados por peixes *in vivo*, exceto pela ação humana, tanto nos procedimentos de laboratório quanto durante a pesca. Na maior parte do tempo, os peixes nadam naturalmente a velocidades que podem ser sustentadas por longos períodos.

B - Exercício prolongado, ou natação aeróbica máxima

Este tipo de exercício apresenta tempo de duração entre 20 segundos e 200 minutos aproximadamente, após o que o resultado é fadiga. Este tipo de

atividade é mais exigente e demanda mais da capacidade metabólica do peixe. Portanto, esse tipo de natação é possível ser suportada somente por curtos períodos. Após esse exercício, deve-se esperar um tempo até que o peixe apresente total recuperação e volte a se alimentar. A demanda energética nesse exercício é atendida tanto pelo metabolismo aeróbico como anaeróbico, que representa o limite máximo antes da exaustão. Note-se aqui que os carboidratos têm papel preponderante para atender a demanda energética, sendo o glicogênio muito utilizado para suportar exercícios submáximos e explosivos (Moyes & West, 1995).

C - Exercício aeróbico de longa duração, ou exercício sustentado

Neste tipo de exercício o peixe é capaz de manter a posição contra a corrente por longos períodos sem atingir a exaustão ou fadiga muscular e sem acúmulo de lactato. Esse exercício é realizado com baixa intensidade, e a velocidade varia de leve a moderada. Teoricamente o peixe pode ser mantido indefinidamente, mas para fins práticos, nesse exercício ele é mantido por mais de 200 minutos. Este tipo de atividade pode ser observado na natureza para diversas espécies, enquanto elas atendem suas demandas respiratórias e mantêm sua flutuabilidade; durante a alimentação a baixas velocidades, e durante a migração de longa distância (Jobling, 1994; Davison, 1997; Holk & Lykkeboe, 1998; Azuma et al., 2002). Nesta situação, os peixes alimentam-se normalmente e a energia de origem exógena é destinada ao metabolismo basal, à manutenção e ao crescimento.

Acredita-se que o exercício de longa duração seja mantido preferencialmente pela oxidação lipídica e protéica (Totland et al., 1987), o que permite maior mobilização de intermediários lipolíticos, como triacilgliceróis e ácidos graxos (Young & Cech Junior, 1994a; Thillart & Raaji, 1995; Weber & Haman, 1996; Forster & Ogata, 1996; Bernard et al., 1999; Yogata & Oku, 2000; Ogata & Oku, 2000). Entretanto, hoje já se sabe que os carboidratos e os lipídeos é que provêm a manutenção energética do organismo, permitindo maior síntese protéica e favorecendo o crescimento dos peixes (Davison, 1997; Wood, 2001).

Quando algumas espécies realizam atividade aeróbica envolvendo até 80% da U_{crit}, elas podem melhorar esse índice (Richards et al., 2002) e aumentar sua tolerância ao exercício atingindo velocidades maiores nos testes subseqüentes (Davison, 1997; Holk & Lykkeboe, 1998). Além desta aclimatação, existem duas consequências metabólicas essenciais com a realização de exercício de resistência: os peixes treinados são metabolicamente menos sujeitos à exaustão e o metabolismo retorna aos valores basais muito mais rapidamente do que peixes não treinados (Lackner et al., 1988; Davison, 1997). Admite-se que o exercício de longa duração otimiza a taxa de conversão alimentar e o crescimento, sendo a atividade ideal no estudo tanto das respostas metabólicas quanto de crescimento frente ao exercício aeróbico (Totland et al., 1987; Jobling, 1994; Davison, 1997; Richards et al., 2002).

Para cada tipo de exercício, há recrutamento de fibras musculares específicas, que podem atuar em conjunto ou não, dependendo da velocidade de natação. Os peixes em sua maioria são compostos basicamente por dois tipos de fibras musculares de locomoção: vermelha e branca, as quais são

histológica e histoquimicamente diferentes (Moyes & West, 1995). Podemos observar na Figura 1, as divisões estruturais dos diferentes tipos de fibras para diferentes espécies.
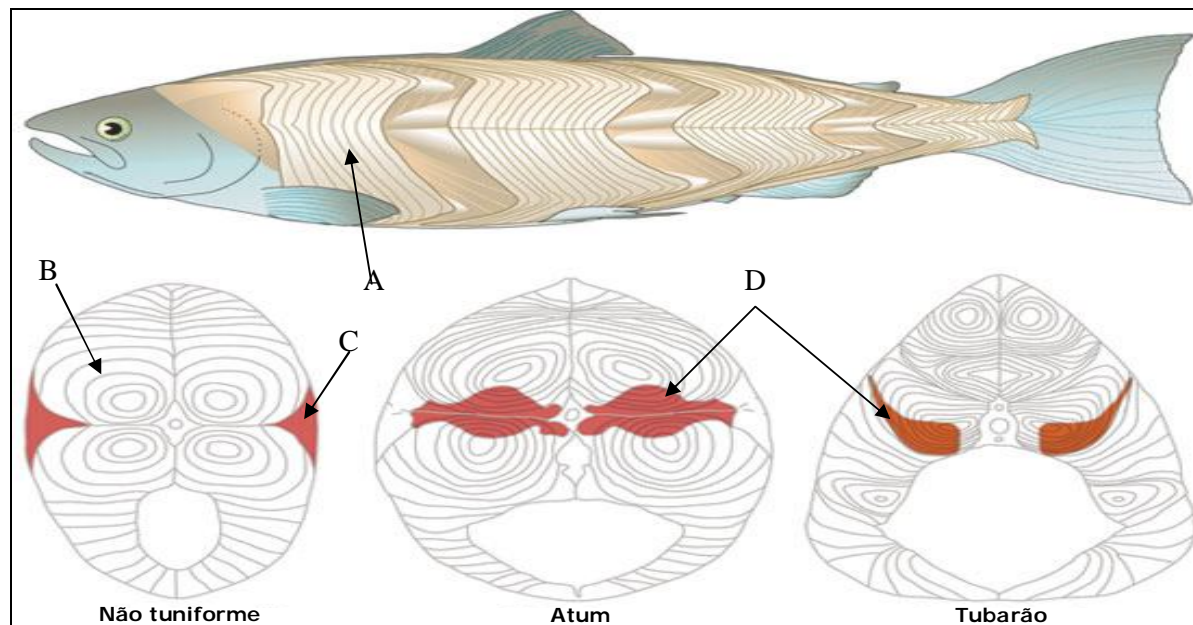
Figura 1. Desenho de tecido muscular vermelho e branco de peixes diferentes. Adaptado de: http://www.americanscientist.org:80/include/popup_full Image.aspx?key=NCWz2dMqY1OIm9utC45yy+Om8IOPKgCE.

Os peixes têm dois tipos de músculo; anaeróbio (branco) e aeróbio (vermelho). O músculo branco é dobrado em uma série de segmentos em forma de “W”, chamados miômeros, um para cada vértebra (Figura 1A). São vistos como cones em secção transversa (Figura 1B). As tunas e os lamnídeos, por exemplo, têm miômeros alongados e mais anéis. Em peixes não tuniformes os músculos vermelhos ficam logo abaixo da pele (Figura 1C), mas em atuns, por exemplo, são encontrados mais internamente, formando lombos nos cones anteriores dos miômeros (Figura 1D). As fibras vermelhas são assim classificadas em razão da alta concentração de mioglobina e maior densidade de vascularização. Este tecido necessita de grande demanda de oxigênio devido à realização de movimentos constantes em condições aeróbicas (Moyes & West, 1995). Essas fibras musculares realizam um tipo de contração que as tornam lentas, mas resistem a tempos prolongados de exercício, ou seja, sua ativação ocorre nos exercícios prolongados e aeróbicos. Em contraste, as fibras brancas são utilizadas para realização de

atividades explosivas, que resultam em movimento repentino, forte e de curta duração. Demandam bastante energia e necessitam quase que inteiramente do metabolismo anaeróbico (Driedzic & Hochachka, 1978).

Como podemos perceber, dependendo da atividade que o peixe realiza podem-se obter diferentes respostas. Quando se pensa em sistemas de cultivo e possíveis aplicações comerciais do exercício, vemos na atividade moderada de longa duração uma coadjuvante na criação mais eficiente de peixes. Muitos trabalhos, principalmente com salmões, registram que o exercício moderado sustentado aumenta o ganho em peso. Além do salmão, espécies como "striped bass" *Morone saxatilis*, "red sea bream" *Pagrus major*, "flounder" *Paralichthys olivaceus,* e "yellowtail" *Seriola quinqueradiata*, também podem ser beneficiadas pelo exercício moderado, apresentando, por exemplo, melhoras nas taxas de conversão alimentar e de crescimento (Jobling, 1993; Young & Cech Junior, 1994a; Jobling, 1994; Davison, 1997; Yogata & Oku, 2000; Ogata & Oku, 2000; Azuma et al., 2002; Bugeon et al., 2003). Até mesmo peixes considerados sedentários como o "yellowtail" e o "striped bass", com pouca habilidade natatória, podem ser beneficiados pelo exercício, apresentando boas taxas de conversão alimentar, peso e comprimento maiores do que aqueles mantidos em ambientes de águas estacionárias (Young & Cech Junior, 1994a; Jobling, 1994; Forster & Ogata, 1996; Azuma et al., 2002; Ogata & Oku, 2000; Bugeon et al., 2003). Mas por que o exercício estimula o crescimento? Quais são as bases metabólicas que respondem a este estímulo? Pode-se compreender metabolicamente o que acontece com peixes que se exercitam?

Existem várias ferramentas bioquímicas, como análise do metabolismo e de atividades enzimáticas, que nos dão acesso às adaptações metabólicas decorrentes das mudanças das condições ambientais. Através dessas análises podemos predizer quais são os processos fisiológicos envolvidos, bem como suas mudanças. Se os peixes crescem mais ao se exercitar, provavelmente deve estar havendo mudança na utilização de substratos energéticos, permitindo melhor aproveitamento de fontes energéticas não-protéicas em favor da economia de proteínas. Sendo assim, as maiores taxas de crescimento em peixes exercitados podem ser explicadas por mudanças comportamentais, mas principalmente pela maior facilidade em utilização de carboidratos e lipídeos para os eventos de demanda energética e maior direcionamento de proteínas para os processos de crescimento.

Benefícios do exercício aeróbico

A - Comportamento

Em qualquer sistema de criação de peixes, independentemente da magnitude da produção, na medida em que transcorre a criação há uma tendência geral de surgir lotes com pesos diferentes (classes de tamanho). Alguns peixes que atingem pesos maiores em menor tempo tendem a se tornarem socialmente dominantes, impondo domínio hierárquico sobre os menores (Baldisserotto, 2002; Kubitza, 2006). Este comportamento agressivo faz com que a mortalidade seja bastante alta e também que alguns peixes se alimentem mais que outros e, portanto, cresçam mais (Jobling & Wandsvik, 1983; Jobling, 1994; Davison, 1997).

Entretanto, admite-se que quando o peixe é submetido à natação sustentada, tanto fica evidente o efeito cardume como a diminuição da agressividade (Christiansen & Jobling, 1990). Em outras palavras, poderíamos dizer que ao se exercitarem os peixes apresentam uma série de comportamentos diferentes: eles se orientam na corrente, melhoram o convívio social, diminuem o nível de dominância, a frequência dos ataques, e muito provavelmente reduzem o nível de estresse (Totland et al., 1987; Jobling, 1994; Davison, 1997).

Salmonídeos submetidos a velocidades moderadas demonstram mudanças comportamentais e modificações no modo de natação em resposta às condições do ambiente de criação. Estes peixes geralmente orientam-se e começam a nadar contra a correnteza, formando cardumes. Observa-se comportamento locomotivo sincronizado, posicionando-se na coluna da água em forma hidrodinâmica (formação de diamante) a fim de diminuir o gasto energético (Blake, 2004). Dependendo da velocidade da água, os salmonídeos diminuem a frequência dos movimentos operculares e começam a nadar com a boca aberta, a fim de que a água entre com suficiente velocidade e força, perfundindo as lamelas branquiais. Deste modo conseguem poupar energia que, em alguns casos, pode chegar a aproximadamente 10% do consumo total de O_2 (Steffensen, 1985). Peixes exercitados também apresentam menores interações antagonistas com tendência reduzida de formação de hierarquia (Christiansen & Jobling, 1990). Peixes expostos à condição de água parada, contrariamente, tendem a aglomerar-se e exibir padrões de locomoção que variam desde um estado imóvel até movimentos explosivos (Leon, 19869; Christiansen et al., 1989; Jobling, 1993; Blake, 2004).

A modificação do comportamento induzido pelo exercício traz duplo benefício aos peixes: diminui o custo energético e reduz a incidência de nadadeiras com feridas ocasionadas por mordeduras. Conseqüentemente, melhora-se a aparência geral dos peixes e também se reduz o risco de infecções ocasionadas por bactérias ou fungos (Christiansen et al., 1991; Jorgensen & Jobling, 1993). Além disso, a natação sustentada pode trazer efeitos benéficos no consumo alimentar e, consequentemente, no crescimento, devido às alterações do comportamento.

Observações subjetivas sugerem que o comportamento antagonístico, em termos de mordidas e perseguições, foi reduzido em juvenis de “artic charr” *Salvelinus alpinus* criados em altas velocidades. Aproximadamente 80% dos controles (sedentários) mostraram evidências de marcas de mordidas e a proporção foi reduzida em 14% em peixes exercitados até 2 CC/seg. Peixes que nadaram a 0,5 e 1 cc/seg também mostraram sinais de ferimentos em ambas as nadadeiras, dorsal e caudal. Desta forma, pode-se afirmar que as alterações comportamentais mostradas pelos peixes exercitados contribuem beneficamente para o crescimento (Christiansen & Jobling, 1990).

B - Desempenho e nutrição

O crescimento pode ser definido como o aumento de tamanho (largura, altura e comprimento), considerando-se a massa estrutural, os órgãos e a mudança de forma ou de composição das partes do indivíduo (Bureau et al.,

2000). A produção de peixes com maior rendimento em filé é objetivo comum tanto da indústria processadora de pescado como da aquicultura, que estão interessadas em maximizar seus sistemas de produção para um produto de ótima qualidade e com retorno econômico atraente (Shearer, 1994).

O crescimento dos peixes depende de alguns fatores, como por exemplo, o potencial genético, razão pela qual algumas espécies crescem mais que outras. Porém, podemos melhorar o crescimento dos peixes desde que as condições de criação sejam ótimas. Entre essas condições temos: a densidade de estocagem adequada, a alimentação de boa qualidade e na quantidade correta, a temperatura adequada da água, a boa qualidade de água, um bom sistema de prevenção de doenças e o manejo em geral (Ceccarelli et al., 2000). Dentre estas condições, o exercício moderado de longa duração é um procedimento que pode contribuir significativamente para a criação mais eficiente de peixes. Esta prática melhora o crescimento, as taxas de conversão alimentar, adapta as respostas fisiológicas e bioquímicas em favor do crescimento, aumenta as taxas de sobrevivência e diminui o comportamento agressivo de diversas espécies (Davison, 1997; Shangavi & Weber, 1999; Yogata & Oku, 2000; Azuma et al., 2002; Hackbarth & Moraes, 2006). As diferenças no crescimento de peixes exercitados ocorrem de acordo com a espécie e com o tipo de treinamento realizado. Mesmo peixes considerados sedentários, com pouca habilidade natatória, podem ser beneficiados pelo exercício (Ogata & Oku, 2000).

Há muitos anos foi amplamente sustentada a idéia entre os criadores de salmonídeos, que a correnteza da água nas unidades de criação causava detrimento do crescimento e da eficiência de produção dos peixes. A razão fundamental para isso é que admitia-se que altos níveis de energia são requeridos para os peixes manterem a sua posição contra a corrente de água, o que levaria a reduzidas taxas de crescimento e/ou aumento nos custos da alimentação (Jobling, 1993). No entanto, existem evidências que demonstram o contrário, isto é, o exercício moderado traz efeitos benéficos aos peixes ao nível fisiológico, morfológico e comportamental. Por exemplo, há aumento nas taxas de crescimento em todas as fases de vida dos salmonídeos quando forçados a nadar em velocidades moderadas por períodos prolongados (Davison & Goldspink, 1977; Leon, 1986; Totland et al., 1987; Houlihan & Laurent, 1987; Davison, 1997; Christiansen & Jobling, 1990; Jobling, 1993; Young & Cech Junior, 1994b). Este mesmo aumento no crescimento foi observado em outras espécies como: bagre do canal *Ictalurus puntactus*; “striped bass” *M. saxatilis*; “whiting” *Merlangius merlagus*; trutas *Salmo truta*, *Oncorhynchus mykiss*, “red sea bream” *P. major* e “yellowtail” *S. quinqueradiata*) e matrinxã *Brycon amazonicus* (Young & Cech Junior, 1993; Young & Cech Junior, 1994a; Jarboe & Grant, 1996; Hammer & Schwarz, 1996; Davison, 1997; Yogata & Oku, 2000; Azuma et al., 2002; Hackbarth & Moraes, 2006; Arbeláez-Rojas, 2007).

Além do aumento de crescimento, existem mudanças positivas no comportamento alimentar. Concomitante ao aumento em peso é observada melhoria na eficiência da conversão alimentar (ganho em peso por unidade de peso de alimento consumido), ou seja, os peixes forçados a nadar em velocidades moderadas por períodos prolongados mostram maior ganho em peso por unidade de alimento consumido do que os criados em água parada.

Embora a melhoria destas duas variáveis seja devido ao efeito benéfico do exercício moderado, também há diminuição na frequência de encontros antagonistas entre os peixes cultivados a velocidades moderadas, quando comparados aos peixes criados na condição de água parada. Desta maneira, os baixos níveis de interações agressivas levam à redução nos custos energéticos permitindo, portanto, maior energia canalizada para crescimento (Christiansen & Jobling, 1990; Haller, 1991; Jorgensen & Jobling, 1993).

Deste ponto de vista, a produção comercial de peixes provenientes de sistemas de criação sob exercício moderado, seria interessante devido ao duplo benefício que traz: aumento na taxa de crescimento e melhoria na eficiência da conversão alimentar (Christiansen & Jobling, 1990; Kestemont & Baras, 2001). A base da melhoria destas duas variáveis deve-se às mudanças fisiológicas produzidas pela atividade do nado prolongado. Em nível muscular, o exercício prolongado em peixes leva ao aumento no tamanho das fibras do músculo vermelho e do músculo branco (hipertrofia), devido a maiores taxas de síntese de proteínas nestes tecidos (Houlihan & Laurent, 1987). Como estes representam 50% a 60% do peso corporal dos peixes, mudanças nestes tecidos terão considerável influência no crescimento do corpo como um todo (Davison & Goldspink, 1977; Johnston & Moon, 1980; Totland et al., 1987; Davison, 1997). Tecidos como as brânquias e o coração apresentam altas taxas de renovação de proteína e baixa eficiência de deposição de proteína. No entanto, no músculo natatório o processo é inverso; há baixa renovação de proteína e alta eficiência de deposição protéica. Aí, essa deposição pode ser maior que 70%, e no corpo inteiro este índice pode variar entre 40%-50% de eficiência (Jobling, 1993). Sendo assim, parece que a melhora de crescimento e eficiência de conversão alimentar observada em peixes, quando forçados a nadar por períodos prolongados a velocidades moderadas, é o resultado da combinação de mudanças comportamentais e de uma série de respostas fisiológicas (Jobling, 1993).

Com a aplicação do exercício moderado, a ração é melhor distribuída e os peixes crescem mais uniformemente (Jobling, 1994; Wood, 2001; Hackbarth & Moraes, 2006; Arbeláez-Rojas, 2007). Quando realizada sem interrupções, esta atividade reorganiza o metabolismo poupando gastos extras provenientes do exercício, permitindo maior síntese protéica e aumentando o catabolismo lipídico e glicídico, o que favorece o crescimento (Davison, 1997; Moyes & West, 1995; Wood, 2001; Richards et al., 2002; Hackbarth & Moraes, 2006; Arbeláez-Rojas, 2007). Matrinxãs *B. amazonicus* exercitados por 72 dias, a velocidade de 1 CC/seg, apresentam melhores taxas de conversão alimentar e de crescimento, com ganho em peso superior a 38% (Hackbarth & Moraes, 2006). Apresentam ainda maior capacidade para oxidar lipídios e carboidratos, com taxa catabólica superior a 40% e 15%, respectivamente. Além disso, observa-se 30% de síntese de proteína muscular (Arbeláez-Rojas, 2007). Pacu exercitado a 1 e 2 CC/seg melhora as médias de peso, comprimento, altura, conversão alimentar (CA) e taxa de eficiência protéica (TEP). Exemplares exercitados a 2 CC/seg crescem mais de 50% em peso e apresentam os melhores valores de CA e TEP, mostrando que o exercício estimula o crescimento, bem como o aproveitamento dos nutrientes da dieta (Hackbarth & Moraes, 2006). É de fundamental

importância se determinar a velocidade correta para a execução da atividade de longa duração para cada espécie.

Visto que o exercício de longa duração favorece o crescimento ao permitir que o peixe metabolize melhor o alimento ofertado, sua execução poderia contribuir para diminuir o problema enfrentado no cultivo de peixes, o qual está relacionado aos gastos com alimentos. Estes representam de 50% a 70% dos custos de produção, e a redução nesta porcentagem pode ser alcançada através da utilização de ingredientes de alta qualidade, do uso de técnicas eficazes de processamento das rações e da aplicação de estratégias na alimentação e na criação (Kubitza, 1998). O exercício aeróbico poderia, desta forma, auxiliar no aproveitamento da dieta proporcionando maior crescimento em menor tempo, pois com sua realização os peixes utilizam melhor as fontes não-protéicas.

Os peixes obtêm energia através do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Todavia, os peixes apresentam preferência marcante pelas proteínas, e a quantidade de aminoácidos requerida está relacionada diretamente ao seu estado nutricional, variando de acordo com a espécie (Moyes & West, 1995). Dietas para *Brycon amazonicus* devem conter pelo menos 28% de proteína (Iziel et al., 2004). *Pseudobagrus fulvidraco* exige 42% de proteína bruta (Kim & Lee, 2005). Para o pacu *Piaractus mesopotamicus*, os melhores resultados de desempenho foram encontrados utilizando-se 22% de proteína bruta (PB) para juvenis e 26% para alevinos (Fernandes et al., 2000, 2007). Entretanto, o excesso de proteínas na dieta diminui o desempenho, aumenta o custo de produção (Kim & Lee, 2005) e deteriora a qualidade da água. Melhorar os índices de conversão alimentar significa usar menos ração para produzir a mesma biomassa de peixes, e invariavelmente, aumentar o lucro na atividade (Kubitza, 1998).

C - Exercício e Estresse

As práticas inerentes à aquicultura, como por exemplo o transporte e o manuseio, são fatores-chave para o sucesso da criação de peixes, tanto pelo estresse que podem causar, como pelos longos períodos de recuperação. Peixes sob condições intensas de cultivo são, inevitavelmente, sujeitos a variados estressores (Iguchi et al., 2002). Por isso, algumas práticas de manejo devem ser aprimoradas visando melhorar a produtividade e o bem-estar dos peixes. Com o fim de restabelecer o equilíbrio inicial, os peixes respondem através de uma série de padrões fisiológicos e metabólicos típicos do estresse (Mazeaud et al., 1981). Dentre as respostas mais utilizadas como indicadoras de estresse, podemos destacar o cortisol, indicador primário de resposta ao estresse. Outras respostas secundárias são as alterações dos parâmetros sanguíneos e eletrolíticos (Mommsen et al., 1999).

O exercício moderado tem se mostrado promissor em atenuar as respostas ao estresse. Os peixes exercitados também são menos sujeitos à exaustão e o seu metabolismo retorna aos valores basais mais rapidamente que os não treinados. Alguns trabalhos também mostram que salmonídeos após estresse agudo, por super população ou manuseio, recuperam seu equilíbrio homeostático mais rapidamente quando submetidos anteriormente a sessões de exercício (Milligan et al., 2000; Milligan, 2003). A prática de exercício moderado prévio ao transporte em peixes contribui no alívio e

tolerância às práticas de transporte e, consequentemente, proporciona melhor bem-estar ao diminuir as respostas de estresse em matrinxã. A intensidade das alterações e o tempo para atingir o completo retorno às condições fisiológicas basais são indicadores bastante úteis da qualidade da manipulação dos peixes. Dessa forma, a partir do momento em que os peixes estejam adequadamente recuperados, eles estarão devidamente prontos para ser inseridos no ciclo de produção, se alimentando, crescendo e se reproduzindo normalmente.

Pacus e matrinxãs criados em exercício sustentado

O Laboratório de Bioquímica Adaptativa de peixes de água doce (UFSCar) vem desenvolvendo alguns trabalhos relativos ao exercício aeróbico de longa duração e suas respostas metabólicas e de crescimento. Até o momento, nossos esforços se concentram em duas espécies – *P. mesopotamicus* (pacu) e *B. amazonicus* (matrinxã) – e observamos que essas espécies mostram resultados de crescimento promissores quando submetidos ao exercício moderado de longa duração.

A – Matrinxã Brycon amazonicus

Devido às características hidrodinâmicas do matrinxã e à sua capacidade de percorrer longas distâncias migratórias reprodutivas e tróficas (Goulding, 1980), essa espécie exibe um modelo biológico muito adaptável e promissório. O matrinxã é considerado um peixe padrão ideal para estudos direcionados a avaliar efeitos do exercício de natação sustentada sobre o metabolismo e o desempenho, possibilitando, desta forma, a adoção de novas técnicas que permitam potencializar seu crescimento em espaços reduzidos. Os trabalhos iniciais realizados com matrinxãs mostram respostas de desempenho positivas, com adaptações metabólicas importantes em decorrência do exercício aeróbico.

Com base nas características potenciais que exibe o matrinxã, Arbeláez-Rojas et al. (2002) conduziram um estudo sob condições de campo, avaliando o desempenho de juvenis de matrinxã e de tambaqui criados sob correnteza moderada em canais de igarapé. Após sete meses de experimentação, juvenis de matrinxã criados sob a correnteza do canal do igarapé, apresentaram melhores respostas de crescimento que os criados em viveiros de água parada (controle). Por outro lado, o crescimento do tambaqui foi similar em ambos os sistemas. A velocidade da correnteza para estimular o crescimento do tambaqui deve ser maior que a utilizada para o matrinxã. A diferença nessas respostas pode estar ligada à história de vida natural entre as duas espécies, refletindo os ecossistemas de sua ocorrência. O exercício moderado de longa duração é eficaz desde que o peixe se exercite dentro da velocidade ideal para sua espécie. Sendo assim, nossos estudos focalizaram os seguintes tópicos: velocidade ideal de crescimento, respostas metabólicas do exercício sobre a densidade de estocagem e efeitos do transporte em peixes condicionados a nadar sob velocidade de nado sustentável.

Matrinxãs Brycon amazonicus exercitados por 72 dias

Matrinxãs exercitados a 1CC/seg por 72 dias mostram taxas de crescimento superiores aos não exercitados (Hackbarth & Moraes, 2006). A atividade aeróbica ininterrupta leva a ganhos superiores a 38% em peso (Tabela 1), fato este já demonstrado em várias espécies, como: salmão *Onchorhynchus masou masou*, “striped bass” *M. saxatilis*, “red sea bream” *P. major*, “flounder” *P. olivaceus,* “yellowtail” *S. quinqueradiata*, truta marrom *S. trutta* (Jobling, 1994; Young & Cech Junior, 1994a; Forster & Ogata, 1996; Azuma et al., 2002; Ogata & Oku, 2000; Yogata & Oku, 2000; Bugeon et al., 2003). A taxa de conversão alimentar também é melhor nos peixes exercitados: 1,94 contra 4,2.

A análise hematológica mostra valores menores de hemoglobina, Volume Corpuscular Médio (VCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), o que poderia indicar que o exercício facilita e/ou melhora o transporte de oxigênio através do sangue, ou talvez, os peixes consigam captar melhor o oxigênio que está chegando, e desta forma, menos hemoglobina precisa estar transportando oxigênio (Tabela 2).

Temos observado que matrinxãs exercitados não têm nas proteínas um substrato energético tão importante. Esses dados de natureza bioquímica estão apresentados na literatura pertinente e confirmam a idéia clássica de que, durante o exercício, o papel dos aminoácidos e proteínas pode ser superior a 90% entre os peixes (Jürs & Bastrop, 1995; Weber & Haman, 1996). Em outras palavras, poderíamos dizer que o catabolismo de aminoácidos não é maior que sua síntese, visto que matrinxã exercitado consegue conservar mais proteína muscular do que aquele mantido em repouso.

Tabela 1. Peso, comprimento e CAA de matrinxãs exercitados por 72 dias. Valores expressam as médias ± desvio padrão.

		Condição	
Peso corporal (g)		Controle	Exercício
	inicial	43,9 ± 13,5[a]	52,7 ± 1,5[a]
	final	54,1 ± 6,3[a]	76,5 ± 4,2[b]
Comprimento corporal (cm)			
	inicial	14,4 ± 1,5[a]	14,6 ± 2,2[a]
	final	16,5 ± 1,9[a]	18,4 ± 1,8[b]
TCA		4.28	1,94*

C_{72} e E_{72} indicam os grupos sedentário e exercitado por 72 dias. TCA: taxa de conversão alimentar. Letras na coluna e * indicam diferenças significativas ($p<0,05$).

Tabela 2. Dados hematológicos de matrinxãs exercitados por 72 dias. Valores expressam as médias ± desvio padrão.

Parâmetros	Condição	
	C_{72}	E_{72}
Hemoglobina (g/dL)	10,0 ± 1,2	9,4 ± 1,1*
VCM (fL)	153,1 ± 36,9	181,3 ± 20,2*
CHCM (g/dL)	29,7 ± 3,0	26,2 ± 2,0*

C_{72} e E_{72} indicam os grupos sedentário e exercitado por 72 dias. VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina média. *indicam diferenças significativas ($p<0,05$).

Efeitos da velocidade no desempenho e adaptações bioquímicas

Temos observado que o metabolismo do matrinxã criado sob exercício sustentado se ajusta a intensidade da velocidade da água mediante algumas respostas tais como o balanço iônico (alterações nas concentrações plasmáticas de sódio e potássio), semcontudo comprometer seu desempenho. Os lipídios são a principal fonte de energia para os músculos locomotivos da maioria dos peixes, e desempenham funções muito importantes ao longo de suas vidas (Sheridan, 1988). Em matrinxã pode-se constatar o papel importante dos lipídios como fonte de combustível para atender a demanda aumentada de energia dos músculos e manter sua posição na correnteza da água. Observa-se 40% da mobilização de ácidos graxos do músculo ventral dos juvenis de matrinxã que nadam nas maiores velocidades (2,0 e 2,5 CC/seg). A mobilização dos ácidos graxos no músculo ventral é significativa. Este tecido parece ser o maior depósito de lipídios corporais nos juvenis de matrinxã. Os matrinxãs, ao receber estímulo da correnteza, posicionam-se na coluna da água em forma de cardume, nadando continuamente. Todavia, para sustentar a contração muscular nessas condições, observa-se queda significativa na mobilização de lipídios viscerais em todos os grupos expostos à natação. Esta mobilização estaria sendo direcionada para atender as demandas metabólicas da contração muscular do músculo vermelho. De acordo com Thillart & Raaji (1995) e Navarro & Gutiérrez, (1995), os lipídios que recobrem as vísceras são os primeiros a serem mobilizados pelos peixes, sendo seguidos pelo fígado e músculos natatórios. De fato, o músculo vermelho dos matrinxãs que nadam em velocidades moderadas (1,0 e 1,5 CC/seg) aumenta seus estoques de lipídios em 30%. Observa-se que os lipídios viscerais desta espécie, são mais facilmente mobilizados que os demais estoques de lipídios.

A velocidade de natação sustentável recomendada para ótimo crescimento de juvenis de *B. amazonicus* está na faixa de 1,0 a 1,5 CC/seg (Figura 2). Acima destas velocidades, os matrinxãs começaram a mobilizar aminoácidos como fonte de combustível para atender as demandas

energéticas. Isto sugere que velocidades de natação muito altas provocam efeitos danosos no metabolismo e, consequentemente, no crescimento de matrinxã. Os perfis metabólicos observados nos juvenis de matrinxã, decorrentes das diferentes velocidades de natação, mostram diferenças significativas na maioria dos intermediários metabólicos. Alguns dos substratos energéticos são utilizados em maior ou menor intensidade entre os músculos e o fígado.
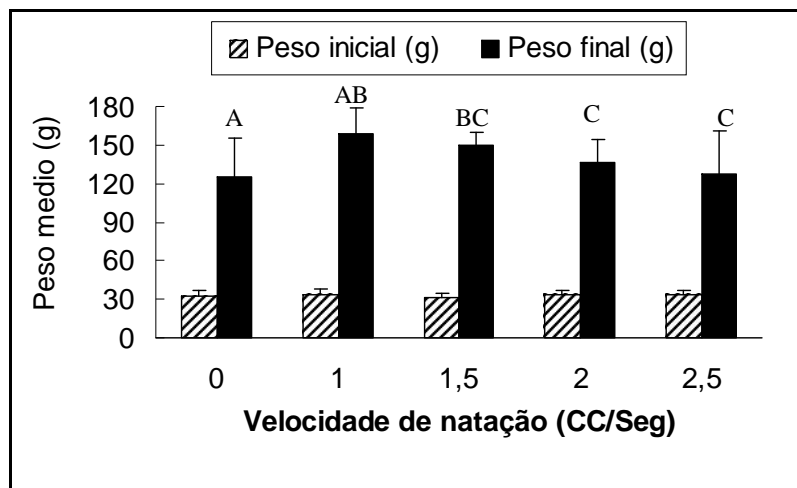
Figura 2. Peso inicial e final de matrinxãs expostos a diferentes velocidades de natação. Valores expressam as médias ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p<0,05$).

Efeitos da velocidade e densidade de estocagem no crescimento e perfil metabólico

De acordo com alguns estudos realizados por Canário et al. (1998) e El-Sayed (2002), à medida que a densidade de estocagem aumenta, há depressão na taxa de crescimento e aumento exacerbado da heterogeneidade de tamanho dos peixes em função de alterações da qualidade da água, do alimento e principalmente motivada por alterações comportamentais da espécie. No entanto, o crescimento de juvenis de matrinxã sob exercício de natação constante e estocados na densidade média (176 peixes/m^3) é 34% maior que em peixes da mesma densidade mantidos em água parada (Figura 3). Inclusive, o peso é 6% maior que os estocados e exercitados em baixa densidade (88 peixes/m^3). Estes resultados sugerem que o exercício potencializa o crescimento e a homogeneidade dos peixes, mesmo aumentando-se a densidade de estocagem. Alguns outros índices

como a sobrevivência e a taxa de conversão alimentar melhoram significativamente nos peixes exercitados.

Os peixes exercitados ganham 1,0 g de peso para cada 1,26 g de alimento consumido, enquanto que os peixes sem exercício têm que consumir 0,54 g de alimento a mais. Ou seja, 1,8 g de alimento para ganhar 1 g de peso. A razão desta eficiência superior dos peixes treinados na conversão deve-se, provavelmente, a maior atividade das enzimas digestivas nos peixes exercitados e menor catabolismo das proteínas, obtendo-se assim, maior eficiência na transformação da proteína da ração em tecido corporal, com menor perda de nitrogênio para o meio ambiente.
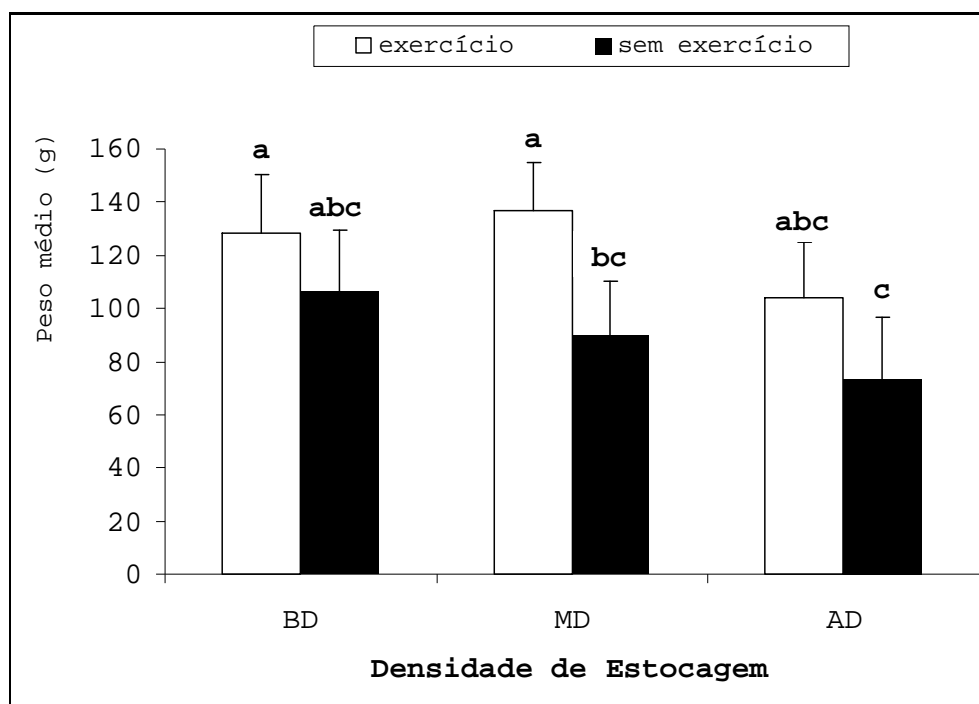
Figura 3. Peso médio de matrinxãs criados em diferentes densidades de estocagem sob exercício moderado. Valores expressam as médias ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p<0,05$).

A densidade de estocagem é considerada um forte estressor crônico que pode afetar a homeostase e causar alterações bioquímicas e fisiológicas (Wedemeyer, 1997). E ainda, demandar energia extra para atender as novas exigências metabólicas impostas pelo estresse de adensamento. Com isto, o peixe é obrigado a mobilizar intensamente as suas reservas de energia, como

glicogênio e lipídios. Estas alterações do balanço energético dos peixes trazem graves consequências, como a diminuição da homogeneidade e alterações do comportamento alimentar, o que acarreta menor crescimento e supressão do sistema imune estimulando o aparecimento de doenças (Weil et al., 2000).

Também são observadas alterações em algumas respostas indicadoras de estresse, como o cortisol, a glicose plasmática e o glicogênio hepático. Esses parâmetros alteraram-se em função tanto da densidade como do exercício. As concentrações basais de cortisol plasmático de todos os peixes, com ou sem exercício, aumentam significativamente segundo a densidade. A ação do cortisol é catabolizante, ou seja, atua indiretamente nos depósitos de combustível para que seja liberada mais energia na forma de glicose, para atender a demanda metabólica e manter a homeostese energética. Neste caso, os teores de glicose sanguínea aumentam conforme a densidade de estocagem e atividade física. No entanto, os valores plasmáticos de glicose dos peixes treinados são significativamente menores. Os depósitos de glicogênio hepático nos peixes sem condicionamento físico são mobilizados em todas as densidades de estocagem, assim como se observa menor catabolismo de proteína nos peixes exercitados.

Os peixes que são criados em altas densidades lançam mão de suas reservas lipídicas para enfrentar as condições adversas do adensamento. Neste caso, o fígado dos peixes estocados em altas densidades sofre queda significativa nos teores de triglicérides plasmáticos e aumento no catabolismo dos ácidos graxos hepáticos. Igualmente observa-se uma quebra aumentada nos triglicérides do músculo branco dos peixes, com ou sem exercício, sendo esta resposta mais severa nos peixes que não foram forçados a nadar continuamente.

Em síntese, é possível verificar que a combinação de exercício de baixa intensidade aliada à densidade de estocagem intermediária (176 peixe/m^3) resulta em melhor desempenho do matrinxã. Embora o metabolismo seja exigido para contornar os efeitos sinérgicos destes dois fatores, é possível demonstrar os efeitos benéficos nos juvenis de matrinxã, refletidos em maiores taxas de crescimento em menor tempo que nos peixes criados em sistemas tradicionais.

Estresse e exercício

Também se observa que após o estresse de transporte, as concentrações plasmáticas de cortisol aumentam unicamente no grupo de matrinxãs sedentários (controle). Devido à ação do cortisol neste grupo, a glicose aumenta 50% mais do que nos peixes treinados e demora duas vezes mais para retornar aos valores basais.

O exercício desempenha papel atenuador das respostas secundárias ao estresse ao permitir o retorno mais rápido aos valores basais da maioria dos índices avaliados nos peixes exercitados. Portanto, a prática de exercício moderado previamente ao transporte em matrinxã contribui para o alívio e tolerância às práticas de transporte, e, consequentemente, proporciona melhor bem-estar ao diminuir as respostas de estresse em matrinxã.

A intensidade das alterações e o tempo para atingir o completo retorno às condições fisiológicas basais são indicadores bastante úteis da qualidade

da manipulação dos peixes. Dessa forma, a partir do momento em que os peixes estejam adequadamente recuperados, eles estarão devidamente prontos para ser inseridos no ciclo de produção, se alimentando, crescendo e até reproduzindo-se normalmente.

B – Pacu Piaructus mesopotamicus

O pacu é um dos peixes de maior valor comercial, tanto na pesca como na piscicultura brasileiras (Urbinati & Gonçalves, 2005). É encontrado nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, tem hábito onívoro, e seu ciclo de vida está relacionado a períodos de alta ingestão de carboidratos. É também um peixe reofílico, nadador por excelência e apresenta grandes teores de gordura na carcaça. Todas estas características podem fazer com que o exercício traga respostas positivas, já que através desta prática há maior consumo de carboidratos e lipídios, e maior economia de proteínas. Como o pacu é um peixe que aproveita muito bem a energia vinda dos carboidratos e dos lipídios (Abimorad et al., 2007), a espécie pode responder positivamente ao exercício.

No entanto, comparando dados de estudos com o matrinxã, em termos de exigência da velocidade da correnteza e sob condições laboratoriais, o pacu mostra respostas de crescimento e metabólicas melhores quando exercitado a 2CC/seg, velocidade esta que é praticamente o dobro daquela encontrada para matrinxãs. Esta informação confirma as observações realizadas por Arbeláez-Rojas et al. (2002), que apontam a importância de velocidade de natação de cada espécie.

Respostas do crescimento de pacu submetido ao exercício

Ratificando estes dados, juvenis de pacus foram exercitados a diferentes velocidades por um mês e observamos que as respostas de crescimento são dependentes da velocidade de natação. Pacus submetidos a velocidades de natação que iam de 0,5CC/seg a 2CC/seg, apresentam a melhor taxa de crescimento específico e os melhores resultados de crescimento em peso, em altura entre 1,5 e 2CC/seg (Tabela 3). Tais resultados são semelhantes a outras espécies, onde o maior crescimento ocorre a velocidades moderadas (Davison, 1997; Yogata & Oku, 2000; Azuma et al., 2002).

É sabido que quando os peixes são exercitados a velocidades moderadas, o apetite é estimulado (Davison, 1997). Observa-se uma correlação positiva entre o consumo da dieta e a velocidade de natação em pacu. Porém, isso não afeta a conversão alimentar devido ao aumento de ganho em peso em função do aumento da velocidade de natação. Quando os peixes consomem mais ração, sem afetar a taxa de conversão alimentar, sabe-se que eles estão fazendo melhor uso da dieta. Portanto, não há custos energéticos extras por conta da atividade imposta, ou seja, quando um peixe se exercita a velocidades moderadas seu crescimento aumentado não se deve necessariamente ao maior consumo de alimento, mas sim, à sua capacidade de convertê-lo eficientemente.

Não se observa em pacu nenhum efeito na taxa de eficiência protéica quando os peixes são submetidos ao exercício contínuo, o que mostra a

utilização de proteína para fins de crescimento e não para fins energéticos; apesar de saber que peixes são grandes consumidores de proteína como fonte energética. O exercício moderado aumenta a oxidação dos carboidratos e lipídios para fins energéticos, direcionando as proteínas para o metabolismo anabólico, o que favorece o seu crescimento (Davison, 1997). Matrinxãs exercitados à velocidade de 1,0 CC/seg apresentam maior retenção de proteína no músculo, ao mesmo tempo em que aumentam a utilização dos carboidratos e lipídios como combustível energético (Hackbarth & Moraes, 2006).

Tabela 3. Variáveis de desempenho de pacus submetidos a diferentes velocidades de natação por 30 dias. Valores expressam as médias ± desvio padrão.

	GP	GC	GA	TCE	CT	CAA	TEP
F para velocidades	14,39*	2,92ns	11,54*	24,75*	176,39*	1,38ns	1,48ns
Coeficiente de variação	11,99	20,38	14,92	7,45	2,90	10,21	12,12
Tratamentos							
controle	28,20^{bc}	1,60	0,87^{b}	1,37^{bc}	29,6^{d}	1,21	3,53
0,5cc/seg	24,06^{c}	1,42	0,82^{b}	1,18^{c}	30,23^{d}	1,34	2,93
1cc/seg	35,91^{ab}	2,10	1,23^{ab}	1,64^{ab}	40,00^{c}	1,30	3,32
1,5cc/seg	44,41^{a}	1,71	1,44^{a}	1,95^{a}	44,50^{b}	1,11	3,69
2cc/seg	44,57^{a}	2,31	1,62^{a}	1,96^{a}	49,00^{a}	1,26	3,30

Valores de F e médias dos ganhos em peso (GP), comprimento (GC), altura (GA), taxa de crescimento específico (TCE), consumo total (CT), conversão alimentar aparente (CAA) e taxa de eficiência protéica (TEP). * significativo; ns: não significativo. Letras a,b,c,d indicam valores diferentes ($p<0,05$).

Podemos afirmar que o pacu submetido ao exercício contínuo apresenta melhores taxas de crescimento sem alterar a conversão alimentar; e velocidade de natação ótima situa-se entre 1 e 2CC/seg. Entretanto, é necessário que se avaliem as bases fisiológicas e bioquímicas do pacu submetido ao exercício contínuo, o que permitirá uma visão mais completa da sua adaptação bioquímica e das suas necessidades nutricionais ao realizar atividade aeróbica contínua.

Respostas metabólicas e de crescimento de pacus exercitados

Pacus exercitados por 60 dias entre 1 e 3CC/seg apresentam boas respostas de crescimento, melhores médias de peso, comprimento, altura,

conversão alimentar e taxa de eficiência protéica (Tabela 4). Ganho em peso (GP), taxa de eficiência protéica (TEP), taxa de conversão alimentar (CAA) e taxa de crescimento específico (TCE) mostraram valores superiores nos peixes que se exercitam, particularmente nos peixes que se exercitaram a 2CC/seg. Pacus submetidos a 1 e 2CC/seg apresentam crescimento em peso superior a 28% e 50%, respectivamente, com maiores médias de comprimento e de altura. No entanto, quando exercitados a 3CC/seg não mostram GP, ganho em comprimento (GC) e ganho em altura (GA) satisfatórios.

Dados de crescimento similares são encontrados em “striped bass” exercitados a 1,5 – 2,4 cc/seg, os quais apresentam taxas de crescimento superiores a exemplares não exercitados; entretanto, velocidades superiores a essas prejudicam o seu crescimento (Young & Cech Junior, 1994a). Trutas arco-íris e esturjões *Acipenser brevirostrum* exercitados a velocidades superiores à atividade aeróbica apresentam várias respostas metabólicas sugestivas de distúrbios fisiológicos, sendo que as trutas arco-íris especificamente apresentam redução de 16% na TCE (Kieffer et al., 2001; Hernandez et al., 2002). Em espécies sedentárias, como o Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, obtém-se maiores ganhos em peso e comprimento corporais quando os exemplares são submetidos à velocidade moderada de 0,9 cc/seg; velocidades superiores a esta causam crescimento insatisfatório (Ogata & Oku, 2000).

Admite-se que o valor ideal de natação para várias espécies de peixes esteja entre 1 e 2CC/seg (Davison, 1997; Azuma et al., 2002; Richards et al., 2002). Peixes exercitados apresentam melhor desempenho produtivo desde que nadem dentro da velocidade ideal para a espécie. Em contrapartida, peixes expostos a condições extenuantes podem sofrer uma série de alterações metabólicas que, inclusive, comprometem seu crescimento (Davison, 1997; Milligan, 1996; Yogata & Oku, 2000; Kieffer et al., 2001; Azuma et al., 2002; Hernandez et al., 2002).

Tabela 4. Variáveis de desempenho de pacus submetidos a três velocidades de natação por 60 dias. Valores expressam as médias ± desvio padrão.

	GC	GA	GP	TCE	CAA	TEP
Controle	2,5 ± 1,1[a, b]	1,1 ± 0,3[a, b]	26,7 ± 7.3[a]	1,33 ± 0,3[a]	2.09 ± 0.83[a]	1.31 ± 0.35[a]
1cc	3,4 ± 0,7[a]	1,5 ± 0,2[a]	34,4 ± 6.2[a,c]	1,51 ± 0,2[a]	1.57 ± 0.38[a]	1.65 ± 0.3[a]
2cc	3,9 ± 0,6[c]	1,6 ± 0,4[c]	40,4 ± 6[b,c]	1,8 ± 0,3[b]	1.1 ± 0.2[b]	2.3 ± 0.3[b]
3cc	2,2 ± 0,3[b]	1,0 ± 0,1[b]	27.4 ± 0.7[a]	1,38 ± 0,1[a]	1.48 ± 0.03[a]	1.7 ± 0.04[a]

GC: ganho em comprimento (cm); GA: ganho em altura (cm); GP: ganho em peso; TCE: taxa de crescimento específico; CAA: conversão alimentar aparente; TEP: taxa de eficiêncie protéica. 1cc; 2cc; 3cc: velocidades de natação. Letras nas colunas indicam diferenças significativas ($p<0,05$).

Durante o exercício de longa duração, o uso de lipídios e carboidratos torna-se maior, promovendo maior crescimento e favorecendo o efeito poupador de proteína (Youg & Cech Junior, 1994; Moyes & West, 1995; Forster & Ogata, 1996; Weber & Haman, 1996; Davison, 1997; Ogata & Oku, 2000; Richards et al., 2002; Wood, 2001). O aproveitamento dos nutrientes em pacu sob exercício é evidente. Os valores de TEP, GP e CAA sugerem que em pacu exercitado a 2CC/seg as proteínas da dieta estão sendo direcionadas para o crescimento ao invés da manutenção energética (Tabela 4). Estes pacus ingerem menos ração e utilizam melhor os nutrientes ofertados o que, consequentemente, leva a maior ganho em peso. Os dados de CAA mostram que pacus que nadam a 2CC/seg consumem 15% menos ração que os demais, indicando que o exercício, além de não estimular o aumento do consumo de alimento, também favorece seu aproveitamento para fins de crescimento. O mesmo fato é observado para outras espécies em exercício, onde o crescimento não é necessariamente devido a um maior consumo de alimento, mas sim, à capacidade de convertê-lo melhor (Davison, 1997; Jobling, 1994; Hackbarth & Moraes, 2006).

O conjunto de dados atuais sobre nado sustentado versus utilização de nutrientes reforça a idéia de que este tipo de exercício direciona as proteínas para o anabolismo, aumentando o desempenho produtivo (Davison, 1997). Os dados obtidos com pacu em exercício a 1 e 2CC/seg são altamente sugestivos de que carboidratos e lipídios são utilizados não somente para atender a demanda imposta pela atividade física mas para maior aproveitamento das proteínas, fato já descrito para algumas espécies (Thillart & Raavi, 1995; Weber & Hamar, 1996; Forster & Ogata, 1996; Bernard et al., 1999; Yogata & Oku, 2000; Ogata & Oku, 2000).

Aplicabilidade e perspectivas

Estes dados preliminares mostram que alguns peixes neotropicais de água doce respondem positivamente ao exercício, apresentando taxas maiores de crescimento, taxas de conversão alimentar positivas e respostas metabólicas que se ajustam à economia de proteínas em favor do crescimento.

É importante salientar que boas práticas de manejo e cultivo trazem benefícios à criação de peixes e, vemos no exercício uma forma prática, barata e rentável para maximização de crescimento de matrinxãs e pacus. Para que a criação sob exercício aconteça, necessita-se de tanques circulares e adaptações físicas das instalações que permitam que a velocidade da água que entra nos tanques seja controlada. Uma vez feito isto, pode-se adequar a velocidade de criação para cada espécie, trazendo resultados que talvez hoje, ainda sejam desconhecidos.

Acreditamos que trabalhos com outros peixes neotropicais, inclusive aqueles com comportamento sedentário, devam acontecer para que possamos estabelecer base de dados confiável sobre as respostas de peixes neotropicais submetidos ao exercício. Também é importante explorar respostas destas espécies relacionando-se nutrição, manejo e respostas ao estresse, bem como respostas encontradas após exposição aos xenobióticos.

Cabe destacar que a produção de peixes treinados a nadar em velocidades sustentadas lhes proporciona maior valor agregado. Nesse

sentido, o exercício sustentado em peixes impõe mudanças positivas na sua composição corporal e perfil bioquímico; mudanças que se traduzem em maiores níveis de energia conferindo ao peixe maior resistência às diferentes práticas de manejo da piscicultura e, consequentemente, sucesso nos sistemas intensivos de produção.

Referências

ABIMORAD, E. G.; CARNEIRO, D. J.; URBINATI, E. C. 2007. Growth and metabolism of pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) juveniles fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. *Aquacul. Res.,* 38:36-44.

ARBELÁEZ-ROJAS, G. 2007. *Efeitos da natação sustentada no crescimento, na densidade de estocagem e na composição corporal em juvenis de matrinxã Brycon amazonicus. Aspectos adaptativos e respostas metabólicas*. 149 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

ARBELÁEZ-ROJAS, G. A.; FRACALOSSI, D. M.; FIM, J. L. 2002. Composição corporal de tambaqui, *Colossoma macropomum* e matrinxã, *Brycon cephalus*, em sistemas de criação intensiva, em igarapé, e semi-intensiva, em viveiros. *Rev. Bras. Zoot.,* 31:1059-1069.

AZUMA, T.; NODA, S.; YADA, T.; OTOTAKE, M.; NAGOYA, H.; MMORIYAMA, S.; YAMADA, H.; NAKANISHI, T.; IWATA, M. 2002. Profiles in growth, smoltification, immune function and swimming performance of 1-year-od masu salmon *Onchorhynchus masou masou* reared in water flow. *Fish. Sci.,* 68C:1282-1294.

BALDISSEROTTO, B. 2002. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. Santa Maria: Editora UFSM.

BERNARD, S. F.; REIDY, S. P.; ZWINGELSTEIN, G.; WEBER, J. M. 1999. Glycerol and fatty acid kinetics in rainbow trout: effects of endurance swimming. *J. Exp. Biol*., 202C:279-288.

BLAKE, R. W. 2004. Review functional design and swimming performance. *J. Fish Biol*., 65:1193-1222.

BUGEON, J; LEFEVRE, F.; PAUCONNEAU, B. 2003. Fillet texture and muscle structure in brown trout (*Salmo trutta*) subjected to long-term exercise. *Aquacult. Res*., 34:1287-1295.

BUREAU, B. P.; AZEVEDO, P. A.; TAPIA-SALAZAR, M. 2000. Pattern and cost of growth and nutrient deposition in fish and shrimp: potential implications and applications. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 5., 2000, Mérida, Yucatán, Mexico. *Memorias*... Mérida: [s.n.].

CANÁRIO, A. V.; CONDEÇA, J.; POWER, D. M. 1998. The effect of stocking density on growth in the gilthead sea-bream, *Sparus aurata* (L). *Aquacult. Res.*, 29:177-181.

CECCARELLI, P. S.; SENHORINI, J. A.; VOLPATO, G. L. 2000. *Dicas em piscicultura: perguntas e respostas*. Botucatu: Santana.

CHRISTIANSEN, J. S.; RINGO, E.; JOBLING, M. 1989. Effects of sustained exercise on growth and body composition of first-feeding fry of arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquaculture*, 79:329-335.

CHRISTIANSEN, J. S.; JOBLING, M. 1990. The behaviour and the relationship between food intake and growth and juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L., subjected to sustained exercise. *Can. J. Zool*, 68:2185-219.

CHRISTIANSEN, J. S.; EVEN, H.; JOBLING, M. 1991. Oxygen consumption in relation to sustaided exercise and social stress in Arctic Charr (*Salvelinus alpinus* L.). *J. Exp. Zool*., 260:149-156.

DAVISON, W. 1997. The effects of exercise training on teleost fish, a review of recent literature. *Comp. Bioch. Physiol*., 117:67-75.

DAVISON, W.; GOLDSPINK, G. 1977. The effect of prolonged exercise on the lateral musculature of the Brown trout (*Salmo trutta*). *J. Exp. Biol*., 70:1-12.

DRIEDZIC, W. R.; HOCHACHKA, P. W. 1978. Metabolism in fish during exercise. In: HOAR, W.; RANDALL, D. J. (Ed.). *Fish physiology*. New York: Academic Press, v. 7, p. 503-543.

EL-SAYED, A. F. 2002. The effects of stocking density and feeding levels on growth and feed efficiency of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L.) fry. *Aquacult. Res*., 33:621-626.

EVANS, D. H. 1993. *The physiology of fishes*. Florida: CRC press.

FERNANDES, F.; MIGUEL, A. G.; CÓRDOBA, M.; VARAS, M.; MÉTON, I.; CASERAS, A.; BANANTE, I. V. 2007. Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth, body composition and liver intermediary enzymes activities in gilthead sea brea (*Spaurus aurata L.*) fingerlings. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*., 343:1-10.

FERNANDES, J. B. K.; CARNEIRO, D. J.; SAKOMURA, N. K. 2000. Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus)*. *Rev. Bras. Zoot.*, 29:646-653.

FORSTER, I. P.; OGATA, H. 1996. Growth and whole-body lipid content of juvenile red sea bream reared under different conditions of exercise training and dietary lipid. *Fish. Sci*., 62:404-409.

GOULDING, M. 1980. *The Fish and florest: explorations in Amazonian natural history*. Berkeley: University of California.

HACKBARTH, A.; MORAES, G. 2006. Biochemical responses of matrinxãs *Brycon cephalus* (Günther, 1869) after sustained swimming. *Aquacult. Res.*, 37:1070-1078.

HALLER, J. 1991. Biochemical cost of a fight in fed and fasted, *Betta splendens*. *Physiol. Behav*., 49:79-82.

HAMMER, C.; SCHWARZ, G. 1996. The effect of prolonged swimming activy on the growth, proximate body composition and caloric content of o-age group Whiting, *Merlangius merlangus* (L. Gadidae). *Arch. Fish. Mar. Res*, 44:13-32.

HERNÁNDES, M. D.; MENDIOLA, P.; COSTA, J.; ZAMORA, S. 2002. Effects of intensive exercise on rainbow trout growth, body composition and metabolic responses. *J. Physiol. Biochem.*, 58:1-8.

HOLK, K.; LYKKEBOE, G. 1998. The impact of endurance training on arterial plasma K^+ levels and swimming performance of rainbow trout. *J. Exp. Biol.,* 201C:1373-1380.

HOULIHAN, D. F.; LAURENT, P. 1987. Effect of exercise training on the performance, growth, and protein turnover of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci*., 44:1614-1621.

IZEL, A. C.; PEREIRA-FILHO, M.; MELO, L. A.; MACÊDO, V. M. 2004. Avaliação de níveis protéicos para a nutrição de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus)*. *Acta Amazonica*, 34:179-184.

JARBOE, H.; GRANT, W. 1996. The efects of water velocity on the growth, dressout, and body composition of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, raised in circular tanks. *J. Appl. Aquacult.,* 6:13-21.

JOBLING, M. 1993. Bioenergetics: feed intake and energy partitioning. In: RANKIN, J. F.; JENSEN, F. B. *Fish ecophysiology*. London: Chapman & Hall, p. 1-44.

JOBLING, M. 1994. *Fish Bioenergetics*. London: Chapman & Hall.

JOBLING, M.; WANDSVIK, A. 1983. Effect of social interactions on growth rates and conversion efficiency of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L. *J. Fish Biol.*, 22:577-584.

JOHNSTON, I. A.; MOON, T. W. 1980. Exercise training in skeletal muscle of brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *J. Exp. Biol*, 87:177-194.

JØRGENSEN, E. H.; JOBLING, M. 1993. The effects of exercise on growth, food utilization and osmoregulary capacity of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 110:233-246.

JÜRSS, K. A.; BASTROP, R. 1995. Amino acid metabolism in fish. In: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. (Ed.). *Metabolic Biochemistry. Biochemistry and molecular biology of fishes.* Amsterdam: Elsevier Science, v. 4, p. 159-190.

KESTEMONT, P.; BARAS, E. 2001. Environmental factors and feed intake. In: HOULIHAN, D. F.; BOUJARD, T.; JOBLING, M. (Ed.). *Food intake in fish*. [S.l.]: Blackwell Science, p. 131-156.

KIEFFER, J. D.; WAKEFIELD, A. M.; LITVAK, M. K. 2001. Juvenile sturgeon exhibit reduced physiological responses to exercise. *J. Exp. Biol.,* 204: 4281-4289.

KIM, L. O.; LEE, S.-M. 2005. Effects of the dietary protein and lipid levels on growth and body composition of bagrid catfish, *Pseudobagrus fulvidraco*. *Aquaculture*, 243:323-329.

KUBITZA, F. 1998. *Nutrição e alimentação de peixes cultivados*. 3. ed. Jundiaí: Degaspari.

KUBITZA, F. 2006. Questões freqüentes dos produtores sobre a qualidade dos alevinos de tilápia. *Panorama Aquicultura*, 16: 14-23.

LACKNER, R.; WIESER, W.; HUBER, M.; VIA, J. D. 1988. Responses of intermediary metabolism to acute handling stress and recoverty in untrained and trained *Leuciscus cephalus* (Cyprinidae, Teleostei). *J. Exp. Biol.,* 140:393:404.

LEON, K. A. 1989. Effect of exercise on feed consumption, growth, food conversion, and stamina of brook trout. Prog. *Fish-Cult.*, 48:43-46.

MAZEAUD, M.M.; MAZEAUD, F. 1981. Adrenergic responses to stress in fish. In: PICKERING, A.D. Stress in fish. London: Academic Press, p. 49-75.

MAZEUD, M. M.; MAZEUD, F.; DONALDSON, E. M. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: Some New data with a general Review. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 106:201-212.

MILLIGAN, C. L. 1996. Metabolic recovery from exhaustive exercise in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.,* 113:51-60.

MILLIGAN, C. L. 2003. A regulatory role for cortisol in muscle glycogen metabolism in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *J. Exp. Biol.*, 206:3167-3173.

MILLIGAN, C. L.; GIRARD, S. S. 1993. Lactate metabolism in rainbow trout. *J. Exp. Biol.,* 180:175-193.

MILLIGAN, C. L.; HOOKE, G. B; JOHNSON, C. 2000. Sustained swimming at low velocity following a bout of exhaustive exercise enhances metabolic recovery in rainbow trout. *J. Exp. Biol*., 203: 921-926.

MOMMSEN, T.; VIJAYAN, M.; MOON, T. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of actions, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish,* 9:211-268.

MOYES, C. D.; WEST, T. G. 1995. Exercise metabolism of fish. In: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. (Ed.). *Metabolic Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Amsterdam: Elsevier Science, v. 4, p. 367-392.

NAVARRO, I.; GUTIERREZ, J. 1995. Fasting and starvation. In: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. (Ed.). *Metabolic Biochemistry, Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Amsterdam: Elselvier Science, v. 4, p. 393-432.

OGATA, H. Y.; OKU, H. 2000. Effects of water velocity on growth performance of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. World Aquacul. Soc.*, 31:225-231.

POSTLETHWAITE, E. K.; McDONALD, D. G. 1995. Mechanisms of Na^+ and Cl^- regulation in freshwater-adapted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during exercise and stress. *J. Exp. Biol*., 198:295-304.

RICHARDS, J. G.; MERCADO, A. J.; CALYTON, C. A.; HEIGENHAUSER, G. J. F.; WOOD, C. M. 2002. Substrate utilization during graded aerobic exercise in rainbow trout. *Exp. Biol.,* 205:2067-2077.

SHANGAVI, D. S.; WEBER, J. M. 1999. Effects of sustained swimming on hepatic glucose production of rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, 202:2161-2166.

SHEARER, K. D. 1994. Factors affecting the proximal composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. *Aquaculture,* 119:63-88.

SHERIDAN, M. A. 1988. Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transport, deposition and mobilization. *Comp. Biochem. Physiol.*, 90B: 679-690.

STEFFENSEN, J. F. 1985. The transition between branchial pumping and ram ventilation in fish: energetic consequences and dependence on water oxygen tensions. *J. Exp. Biol.*, 114:141-150.

TAYLOR, S. E.; EGGINTON, S.; TAYLOR, E. W. 1995. Seasonal temperature acclimatisation of rainbow trout: cardiovascular and morphometric influences on maximal sustainable exercise level. *F. Exp. Biol.,* 199:835-845.

THILLART, G. V. D.; RAAJI, M. 1995. Endogenous fuels; nom invasive versus invasive approaches. In: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. (Ed.). *Metabolic Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Amsterdam: Elsevier Science, v. 4, p. 33-64.

TOTLAND, G. K.; KRYVY, H.; JODESTOL, K. A.; CHRISTIANSEN, E. N.; TANGERAS, A.; SLINDE, E. 1987. Growth and composition of the swimming muscle of adult Atlantic Salmon (*Salmo salar.*) during long-term sustained swimming. *Aquaculture,* 66: 299-313.

URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F. D. 2005. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Ed.). *Espécies Nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: UFSM, p. 225-256.

WEBER, J. M.; HAMAN, F. 1996. Pathways for metabolic fuels and oxygen in high performance fish. *Comp. Bioch. Physiol*., 113:33-38.

WEDEMEYER, G. A. 1997. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Ed.). *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: University Press, p. 35-71.

WEIL, L. S.; BARRY, T. P.; MALISON, J. A. 2001. Fast growth in rainbo trout is correlated with a rapide decrease in post-stress cortisol concentrations. *Aquaculture*, 193:373-380.

WOOD, C. M. 1991. Acid-base and ion balance, metabolism, and their interactions, after exhaustive exercise in fish. *J. Exp. Biol*., 160:285-308.

WOOD, C. M. 2001. Influence of feeding, exercise and temperature on nitrogen metabolism and excretion. In: WRIGHT, P.; ANDERSON, P. *Nitrogen excretion*. California: Academic Press, p. 201-238.

YOGATA; H.; OKU, H. 2000. The effects of swimming exercise on growth and whole-body protein and fat contents of fed and unfed fingerling yellowtail. *Fish. Sci*., 66:1100-1105.

YOUNG, P. S.; CECH JUNIOR, J. J. 1993. Effects of exercise conditioning on stress responses and recovery in cultured and wild young-of-the-year striped bass (*Morone saxatilis*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50:2094-2099.

YOUNG, P. S.; CECH JUNIOR, J. J. 1994a. Optimum exercise conditioning velocity for growth, muscular development, and swimming performance in young-of-the-year striped bass, (*Morone saxatilis*). *Can. J. Fish. Aqua. Sci.*, 51:1519-1527.

YOUNG, P. S.; CECH JUNIOR, J. J. 1994b. Effects of different exercise conditioning velocities on the energy reserves and swimming stress responses in young-of-the-year striped bass (*Morone saxatilis*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51:1528-1534.

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 11

Adaptação funcional do peixe pulmonado *Lepidosiren paradoxa*

José Luiz Martins do Nascimento, Maria Lúcia da Silva Ribeiro, Barbarella de Matos Macchi, Tecia Maria Ulisses de Carvalho & Renato Augusto DaMatta

Resumo
Os peixes pulmonados, pertencentes a ordem Dipnoi, estão representados na natureza por três gêneros: Neoceratodus na Austrália, Protopterus na África e Lepidosiren na América do Sul e constituem um grupo de animais cujas características especiais, apresentam grande interesse para o estudo evolutivo e adaptação funcional. A espécie amazônica, L. paradoxa vive em águas pobres em oxigênio com adaptação às condições do ambiente, que possibilitam a respiração aérea e a capacidade de poder viver estivado. Dessa forma, podem apresentar alta capacidade de adaptação funcional para manter as funções vitais. Nestas condições, são capazes de captar o oxigênio do ar, porém sem substratos alimentares, é possível que se mantenham somente às custas da baixa taxa de seu metabolismo basal. Por outro lado, mudanças de ambiente podem alterar as respostas metabólicas para favorecer a sobrevivência devido à demanda energética ou ainda constituir um fator que predispõe a geração de radicais livres, como ânions superóxido ($O_2^{\bullet -}$) *e peróxido de hidrogênio* (H_2O_2). *Situações de estresse oxidativo são inevitáveis em função do estilo de vida aeróbico. Devido às características hematológicas do peixe pulmonado, com hemácias de grande tamanho e seu potencial oxirredutor, experimentos foram realizados para correlacionar essas características através de marcadores de estresse oxidativo, como glutationa e superóxido dismutase (SOD), mantendo os peixes em condições de estivado e não estivado. Também foi possível estudar o perfil hematológico e os níveis de glicose nessas condições experimentais. Os resultados indicam que o L. paradoxa não mostra alterações nos valores de hematócrito e concentração de hemoglobina, quando comparados os estados estival e não estival. No entanto, os índices de glicemia sanguínea apresentaram-se significativamente mais baixos nos animais estivados. Encontramos níveis diferenciados de atividade da enzima SOD em L. paradoxa, onde a atividade*

da enzima é significativamente elevada quando o animal encontra-se em estado não estival em relação ao estado estival. Níveis diminuídos da glutationa foram observados nos peixes em estado estival. Estes dados sugerem que a resposta metabólica ao estresse induzido pode ser diferenciada dependendo da espécie e, provavelmente, das condições a que são submetidas. Estas observações reforçam a interpretação de um estado de depressão metabólica durante o estado estival. Investigações posteriores são também importantes para esclarecer melhor a capacidade de adaptação funcional desta espécie.

Abstract

Lung fish, of the Dipnoi order, are represented in nature by three genera: Neoceratodus in Australia, Protopterus in Africa and Lepidosiren in South America. They are included in an animal group with special characteristics, which shows great interest to evolutive and functional adaptation studies. The Amazonian specie, L. paradoxa, lives in places with low oxygen and adapted to its environmental conditions, with the ability to breathe air and to stowed. Thus, they may show high capacity of functional adaptation to maintain vital functions. In this situation, they are able to capture the oxygen from the air, but without food substrates, it is possible that they remain alive only at the expense of its low rate of basal metabolism. Moreover, changes in environment may alter the metabolic responses to promote survival due to energy demand or as a factor that predisposes the generation of free radicals such as superoxide anions ($O_2^{\bullet-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2). Oxidative stress is inevitable in aerobic lifestyle. Due the hematological characteristics of the lung fish, with large red cells with high oxirredution potential, experiments were performed to correlate these characteristics with markers of oxidative stress such as glutathione and superoxide dismutase (SOD), in fish in a stowed and not stowed conditions. It was also possible to study the blood profile and glucose levels in these experimental conditions. The results indicate that L. paradoxa shows no changes in values of hematocrit and hemoglobin concentration when stowed and not stowed were compared. However, the glucose levels in the blood were significantly lower in stowed animals. We found different levels of SOD activity in L. paradoxa, with significantly higher levels animals that were not stowed. Reduced levels of glutathione were observed in stowed fish. These data suggest that the metabolic response to the induced stress may change according to different species and probably to the conditions which are submitted. These observations support the interpretation of metabolic depression during the stowing. Further investigations are also important to elucidate the functional adaptation capacity of this specie.

Introdução

Os peixes ósseos da classe Osteichthyes, provavelmente, originaram-se de ancestrais da Era Siluriana que iniciou há 430 milhões de anos. De grande significado para a história evolutiva é o fato de que, não muito tempo depois desta classe ter se diferenciado, dividiu-se em duas linhas de desenvolvimento. Uma delas levou ao grupo mais bem sucedido, o Actinopterygii, ou peixes de nadadeiras raiadas, cujo número de espécies

vivas excede ao de todos os vertebrados reunidos. A outra linha, o Sarcopterygii, peixes com nadadeiras carnosas, deu origem aos vertebrados terrestres (tetrápodes). Ainda que os Actinopterygii sejam um grupo de vertebrados próspero e dominante, os Sarcopterygii foram um grupo dominante em meados e fins da Era Paleozóica que começou há cerca de 570 milhões de anos e durou cerca de 340 milhões de anos. As formas existentes são morfologicamente similares aos seus ancestrais do período devoniano que iniciou há 395 milhões de anos e são considerados importante elo evolutivo da transição dos vertebrados aquáticos para os terrestres, o que justifica mais estudos nessas espécies.

Os membros da linha Sarcopterygii estão divididos em duas ordens: Crossopterygii e Dipnoi. Os primeiros, chamados de peixes com nadadeiras lobadas, teriam sido os ancestrais dos anfíbios. A ordem Dipnoi compreende os peixes pulmonados, que também eram abundantes na Era Paleozóica e que persistem ate hoje (Ahlberg et al., 2006)).

Os peixes dipnóicos estão representados na natureza por três gêneros: *Neoceratodus* na Austrália, *Protopterus* na África e *Lepidosiren* na América do Sul. No gênero *Protopterus* foram encontradas quatro espécies; os outros dois apresentam somente uma única espécie cada. Estes peixes constituem um grupo de animais que pelas características especiais, apresentam grande interesse para o estudo evolutivo e adaptação funcional (Pérez-Gonzalez & Grinkraut, 1971).

Os peixes pulmonados têm características comuns com os anfíbios primitivos, o que os coloca no grupo ou próximo ao grupo ancestral que deu origem aos tetrápodes (Nelson, 1984). As formas existentes são similares aos seus ancestrais devonianos, e são consideradas importante elo evolutivo na organização dos vertebrados.

Os peixes dipnóicos despertam muito interesse devido as suas características especiais que vêm sendo observadas desde a descoberta do *Protopterus annectens* na África, em 1835 (Jardine, 1841) e do *Lepidosiren paradoxa* na Amazônia, em 1836 (Bischoff, 1840). Estes peixes possuem a forma de enguia, com corpo revestido de escamas e dois pares de apêndices flageliformes que lembram extremidades em estado rudimentar. Comumente apresentam o tegumento de cor cinza-escura com algumas manchas discretas. Possuem ainda uma nadadeira mediana interrompida que guarnece tanto a metade posterior do dorso como do abdome. Sob o ponto de vista filogenético, o que mais impressiona são suas características anatômicas, representada por legítimos pulmões, o que coloca essas espécies na zona limítrofe entre peixes e anfíbios (Goeldi, 1898). Os dipnóicos vivem em águas pobres em oxigênio e, além de mostrarem notável adaptação às condições do ambiente, oferecem também um exemplo de modificações fundamentais nos sistemas respiratório e circulatório, as quais possibilitam respiração aérea e a capacidade de poder viver estivado (Pérez-Gonzales & Grinkraut, 1971).

Estes peixes habitam lugares alagados e apresentam capacidade excepcional de estivação na estação da seca quando conseguem esconder-se em escavações verticais que constituem verdadeiros “ninhos” na lama. Esses ninhos são forrados com muco que ao secar forma um “casulo”, no qual há uma pequena abertura ou tubo pelo qual a boca do peixe fica em contato com o meio exterior, permitindo a ventilação dos pulmões. Este comportamento estival está bem estudado no *Protopterus* e em *Lepidosiren.*

Portanto, os peixes pulmonados são capazes de suportar meses de seca. Nestas condições, apesar de captarem oxigênio do ar, é possível que o animal se mantenha somente às custas da baixa taxa de seu metabolismo basal, principalmente devido à falta de substratos alimentares. Em razão dessa alternância no ambiente, esses peixes devem apresentar alta capacidade de adaptação funcional para manter suas funções vitais e, portanto, são modelos para esse tipo de estudo. Embora a piramboia *Lepidosiren paradoxa* não seja um peixe usualmente cultivado, devido à potencialidade econômica da piscicultura, existe a iminente necessidade de se entender as adaptações dessa espécie para uso dos conhecimentos em estudos filogenéticos, bem como em outras aplicações práticas.

Espécie *Lepidosiren paradoxa*

O peixe pulmonado *L. paradoxa* é citado no Boletim do Museu Paraense Emílio Göeldi, 3º fascículo (1896), o qual ressalta a necessidade de “popularizar conhecimentos acerca da forma, maneiras de vida e importância do notável peixe *L. paradoxa*”. No mesmo boletim, o autor cita “Hoje podemos comunicar que o *L. paradoxa* foi redescoberto e desta vez numa localidade nova, na foz do Amazonas, na ilha de Marajó no cabo do Maguari”. O peixe *L. paradoxa* é o único dipnóico que vive na bacia Amazônica e na bacia do rio Prata (Coelho & Sawaya, 1972).

Essa espécie foi descoberta por Natterer em 1836 e sua denominação bem como a comunicação de sua classificação foi feita por Fitzinger em 26 de setembro de 1836, que a denominou *L. paradoxa* (Baur, 1908). Na época foi considerado um anfíbio. É conhecido na Região Norte do país pelos seguintes nomes: caramurú, nome regional de Borda (Bischoff, 1840), trayra-M’boya, nome nativo citado por Lankester (1896), pirarucu-bóia e cobra (Göeldi, 1898), tambaki M’boia, caraucuru, trairambóia, minhocão e amoréia, indicação dada por Sawaya em 1970 (Shinomiya, 1970). O peixe é também bastante conhecido como pirambóia, o que sugere uma fusão de nomes como pirarucu-bóia e trairambóia.

Na Região Norte do País, as estações do outono e primavera são bastante indefinidas. Verão e inverno são as estações que determinam importantes mudanças climáticas na região. O inverno, com chuvas fortes e constantes ocorre normalmente entre os meses de janeiro a junho. O verão, período em que ocorrem chuvas frequentes, seguidos de períodos de falta de chuva, pode ser intenso de setembro a dezembro com fases de 15, 20 dias ou até mais sem chuvas, em algumas áreas como, por exemplo, a região da Ilha do Marajó ou o sul do Pará. A espécie pode ser encontrada estivando no período da seca, ou seja, no verão quando desenvolve adaptações metabólicas para enfrentar as alterações hidrológicas em seu ambiente. Há referências quanto à permanência dos peixes em estado estival durante quatro meses e da readaptação quando ao retorno das águas (Coelho & Sawaya, 1972). É comprovado que há modificações na pele e que, ao terminar o período estival, apresenta pele translúcida e com pouco muco. O animal apresenta neste período logo após a estivação, uma cor total cinza-claro que vai escurecendo à medida que sofre a ação da luz, mesmo imerso na água (Coelho & Sawaya, 1972).

Descrições encontradas na literatura sobre a ultraestrutura de tecidos mostram que os animais estivados possuem alta concentração de glicogênio no músculo e estudos sobre metabolismo especializado durante a estivação revelam níveis enzimáticos diminuídos de malato desidrogenase, fosfoglicose mutase, fosfoglicose isomerase, glicose-6-fosfato desidrogenase e superóxido dismutase comparativamente com peixes em estado não estival. Estes dados sugerem alta capacidade anaeróbica no músculo esquelético e cardíaco no período estival quando as enzimas mostram atividades mínimas, indicando supressão metabólica (Mesquita-Saad et al., 2002).

Apesar destas características que os aproximam dos anfíbios, essas espécies pulmonadas conservam aspectos da classe dos peixes, como por exemplo, a presença de fendas branquiais (Brien & Bouillon, 1959; Mimura & Sawaya, 1977). Apesar da importância desse peixe devido a sua posição na evolução de vertebrados, ainda existem poucos estudos acerca de sua hematologia e adaptação funcional.

Adaptação funcional da espécie *Lepidosiren paradoxa*

Conforme citado, os peixes pulmonados habitam lugares alagados e apresentam capacidade excepcional de estivação na estação da seca, quando se escondem em escavações verticais que constituem “ninhos” na lama. Nessa condição, são capazes de suportar meses de seca. No entanto, apesar de manterem um canal de comunicação com o meio, o que possibilita captação de oxigênio, é possível que este aporte seja insuficiente. Ademais, como o animal fica restrito ao casulo, ocorre diminuição de substratos alimentares necessários para sua oxidação. Devido a essa troca de ambiente, estivado e não estivado, com pobre oferta de oxigênio, os peixes pulmonados devem apresentar alta capacidade de adaptação funcional para manter suas funções vitais.

Por outro lado, mudanças de ambiente podem promover modificações nas respostas metabólicas com o objetivo de favorecer a sobrevivência considerando as demandas energéticas. É provável que essas mudanças constituam um fator predisponente à geração de radicais livres, como ânions superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma vez que situações de estresse oxidativo são inevitáveis em função do estilo de vida aeróbico. Os peixes pulmonados são constantemente submetidos a condições ambientais agressivas, pois esses animais, mesmo em estado não estival, encontram-se geralmente em ambientes pobres em oxigênio devido à decomposição de matéria orgânica do ambiente alagado. Quando estivados ficam impossibilitados de realizar a respiração branquial sendo a captação de oxigênio provavelmente insuficiente para suprir as necessidades metabólicas.

Estresse oxidativo e mecanismos de defesa antioxidante

A produção de radicais livres causa efeitos deletérios para esses organismos e a proporção do dano depende do tipo de organismo, seu estado fisiológico e suas defesas antioxidantes. Os radicais livres mais importantes são aqueles derivados do oxigênio, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ROS) e produzidos como conseqüência da respiração aeróbica e da oxidação de substratos. Pequenas quantidades de ROS são geradas

constantemente em organismos aeróbicos em resposta a estímulos internos e externos (Hurst et al., 1997; Jornot et al., 1998; Mills et al., 1998).

Apesar de desempenhar papel crucial nos processos biológicos normais, as ROS são altamente reativas, podendo causar danos celulares, como rompimento de membrana, inibição das funções enzimáticas celulares, modificações no DNA, os quais conduzem à morte celular (Freeman & Crapo, 1982). Baixos níveis de ROS são indispensáveis em muitos processos bioquímicos, incluindo sinalização intracelular, eventos de crescimento, diferenciação, apoptose (Ghosh & Myers, 1998), e defesa contra micro-organismos (Bae et al., 1997; Lee et al., 1998). Quando gerados em altas quantidades ou mecanismos inadequados de remoção de ROS, resultam em estresse oxidativo que pode causar várias disfunções metabólicas e prejuízos biológicos a macromoléculas (Chopra & Wallace, 1998; Wojtaszek, 1997).
Para prevenir ou diminuir a lesão celular causada pelo estresse oxidativo, as células possuem mecanismos bioquímicos de defesa antioxidante. Esses mecanismos consistem em: prevenir a formação excessiva de radicais livres; converter espécies oxidantes em menos tóxicas; preservar a compartimentalização celular e reparar o dano induzido pelas ROS (Do Nascimento et al., 2008). Essas defesas bioquímicas incluem um sistema complexo de enzimas antioxidantes e moléculas de baixo peso molecular (Kurata et al., 1993).

Dentre estes mecanismos de defesa, temos os enzimáticos, como exemplo, as enzimas superóxido dismutase, glutationa peroxidase e catalase, e os não-enzimáticos, como o tripeptídeo glutationa presentes nas células; esses mecanismos podem ser avaliados usando-se diferentes métodos bioquímicos, morfológicos e funcionais (Beaudeux et al., 1996; Stait & Leake, 1996).

Importantes alterações em parâmetros metabólicos podem ser observadas quando os animais são submetidos a condições ambientais diferenciadas, que também podem induzir mudanças nas propriedades cinéticas das enzimas, com variação nos valores da constante de Michaelis (Km) e da velocidade máxima (Vmax) (Weiser et al., 1987). Estas mudanças podem também ser observadas em peixes quando submetidos a condições de estresse causado por alterações na temperatura, diminuição de níveis de oxigênio e poluição, entre outros. Estados de estivação também podem causar depressão ou supressão metabólica (Hochachka & Guppy, 1987). Em revisões da literatura sobre as principais características bioquímicas metabólicas dos peixes de respiração aérea, os peixes pulmonados são descritos como semelhantes a vertebrados resistentes a baixas concentrações de oxigênio porque usam preferencialmente carboidratos ao invés de lipídeos. Os estoques de glicogênio no músculo esquelético e cardíaco destes peixes são suficientes para fornecer energia durante longos períodos de estivação (Almeida-Val & Hochachka, 1995).

As principais evidências da ocorrência de depressão oxidativa são, a ausência da depleção de glicogênio, acúmulo de lactato, mudança na relação piruvato/lactato, mudança na concentração de adenilato ou depleção da creatina fosfato no músculo durante estados de submersão (Dunn et al., 1983). Desse modo, mesmo os peixes pulmonados apresentam relativamente alto poder glicolítico em muitos tecidos e rotineiramente utilizam proteínas e aminoácidos como combustível metabólico (Hochachka, 1980). Por esta

razão, o fígado e o rim destes peixes mantém uma significativa capacidade para gliconeogênese, bem como para o metabolismo de aminoácidos. Diante do exposto, pode-se esperar diminuição na atividade enzimática do metabolismo oxidativo quando os peixes estão em estado de estivação.

A principal função do NADPH em glóbulos vermelhos é de reduzir a forma dissulfeto da glutationa à forma sulfidrílica em uma reação que é catalisada pela glutationa redutase. A forma reduzida da glutationa, um tripeptídeo com uma sulfidrila livre, serve como um tampão de sulfidrilas que mantém os radicais de cisteína de hemoglobina e de outras proteínas da hemácia no estado reduzido. A forma reduzida também exerce um papel na detoxificação ao reagir com peróxidos orgânicos. A glutationa reduzida é essencial para a manutenção da estrutura normal das hemácias e para manter a hemoglobina no estado ferroso. Células com um nível diminuído de glutationa reduzida são mais suscetíveis à hemólise (Stryer, 1996).

A glutationa reduzida presente na maioria das células pode detoxificar quimicamente o H_2O_2 em reação catalisada pela glutationa-peroxidase, dependente de selênio, formando glutationa oxidada, a qual não mais apresenta propriedades protetoras. A célula regenera a glutationa reduzida em uma reação catalisada pela glutationa redutase usando NADPH como fonte de elétrons redutores. As hemácias são totalmente dependentes da via das pentoses fosfato para seu suprimento de NADPH, pois, diferentemente da maioria dos outros tipos celulares, não tem fonte alternativa dessa coenzima essencial (Champe & Harvey, 2006). Se a glicose-6-fosfato desidrogenase estiver de alguma forma deficiente, os níveis de NADPH diminuirão, e a glutationa oxidada não poderá ser reduzida. Como conseqüência, o H_2O_2 se acumulará, colocando em risco a estabilidade da membrana e causando lise das hemácias. Outras enzimas como superóxido dismutase e catalase, catalisam a conversão de outros intermediários tóxicos de oxigênio em produtos inofensivos. Como grupo, essas enzimas servem como sistema de defesa contra os efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio (Champe & Harvey, 2006).

Resposta ao estresse em peixes

O estresse é definido como um desequilíbrio ou perturbação no organismo animal. Este desequilíbrio resulta da ação de substâncias produzidas internamente ou estímulos externos comumente definidos como estressores. A resposta fisiológica pode ser a um único estressor, a um grupo específico ou a diferentes tipos de estressores. Estas respostas envolvem todos os níveis de organização interna e são chamados de resposta integrada ao estresse. Outros estudos têm mostrado o importante papel de outros hormônios envolvidos neste evento, mas a predominância das catecolaminas e glicocorticóides são reconhecidas como importantíssimas. Estes dois hormônios são as duas maiores rotas através das quais o cérebro coordena a resposta ao estresse (Chrousos & Gold, 1992).

Os mecanismos neuroendócrinos de controle da resposta ao estresse em peixes são comparáveis aos dos mamíferos. No entanto, a resposta ao estresse em peixes tem características que são próprias deste grupo e são relacionadas a estruturas específicas, como a branquial. A identificação do estresse em peixes em condições de laboratório é complicada, pois vários

fatores podem modificar esta resposta, tais como: temperatura, qualidade da água, época, idade, gênero, fatores sociais, características individuais inerentes ou adquiridas e ainda a linhagem ou espécies diferentes (Ursin & Olff, 1993). Considerando isto, a resposta ao estresse é muito variável. Para a avaliação da resposta integrada ao estresse em peixes, tem sido considerado conceito de respostas primária, secundária e terciária (Pickering, 1990; Wedemeyer et al., 1990; Oba et al., 2009).

Como resposta primária considera-se a ativação do centro cerebral resultando em massiva liberação de catecolaminas e corticosteroides. A resposta secundária é usualmente definida como as ações e efeitos imediatos desses hormônios no sangue e nos tecidos, incluindo o aumento do rendimento cardíaco, da captação de oxigênio, mobilização dos substratos energéticos e perturbação do balanço hidromineral. Respostas terciárias se relacionam ao nível de organismo e população, tais como: inibição de crescimento, reprodução, resposta imune e redução da capacidade de tolerabilidade a estressores.

Quanto aos efeitos dos estressores nos níveis de glicose sangüínea, a hiperglicemia foi observada em muitas espécies de peixes. No entanto, a ausência de aumento da concentração de glicose no plasma tem sido relatada para algumas espécies de peixe, mas tem sido interpretada, entre outras razões, como incapacidade de se adaptar ao cativeiro (Barton & Iwama, 1991). De modo geral, as espécies podem apresentar relevantes diferenças no metabolismo energético durante estados de estresse, mas este aspecto da fisiologia dos peixes precisa ser mais bem investigado. Os esturjões são considerados fósseis vivos (Bemis et al., 1997). Esta espécie mantém características primitivas como o esqueleto cartilaginoso, que tem sido mantido por aproximadamente 150-200 milhões de anos a despeito de grandes mudanças no meio ambiente (Bemis et al., 1997). Índices hematológicos foram estudados na espécie *Acipenser brevirostrum* em condições de estresse fisiológico. O hematócrito está diminuído, mas o conteúdo da hemoglobina total e os níveis de glicose não apresentaram diferenças (Beyea et al., 2005).

Com relação ao crescimento das espécies de peixes em geral, foi observado que há redução ou inibição do crescimento durante estados de estresse e este fato conduz a mudanças no peso corporal (Goede & Barton, 1990). A diminuição no crescimento tem sido correlacionada a aspectos físicos, sociais e estressores químicos incluindo rápidas mudanças de temperatura, condições de captura, manuseio, presença de poluentes entre os quais se incluem o baixo pH da água, presença de alumínio, metais pesados e outras substâncias químicas (Goede & Barton, 1990). Ainda com relação a indicadores sangüíneos é importante observar que a quantidade de hemácias existente no sangue é um indicador de grande importância na avaliação do perfil hematológico dos indivíduos. A sua expressão mais simples é o hematócrito, que representa o percentual do volume ocupado pelas hemácias no sangue e tem, geralmente, relação direta com a quantidade de hemoglobina. Assim, o hematócrito é um indicador indireto da capacidade do sangue de transportar oxigênio aos tecidos.

Tendo em vista os aspectos citados, o estudo da espécie *L. paradoxa* visa acrescentar informações relativas à caracterização do estilo especial de vida desse peixe pulmonado. Por outro lado, as condições de sobrevivência

em estado estival e não estival torna interessante a avaliação de respostas metabólicas relativas a sua adaptação funcional. Características primitivas mantidas por esta espécie justificam também o interesse na realização de novos estudos, tendo em vista a importância deste peixe na cadeia evolutiva dos vertebrados.

Métodos de estudos hematológicos e bioquímicos em *Lepidosiren paradoxa*

Peixes e obtenção de sangue

Foram utilizados espécimes de *Lepidosiren paradoxa* capturados nas baixadas e alagados nos arredores de Belém, PA, com tamanhos variando entre 30 e 60 cm de comprimento. Após a captura, os animais foram mantidos em um tanque medindo 1,5 metro de comprimento por 75 cm de largura com 60 cm de profundidade. Do total da área do tanque, uma parte menor (40 x 40 cm) foi separada para acomodação dos animais utilizados como controle e que permaneceram em estado não estival. Na parte maior do tanque foi reproduzido o ambiente de estivação dos peixes em seu habitat natural com a colocação de terra própria de mangues e alagados, criando-se assim uma superfície relativamente seca. Na parte destinada ao controle, semanalmente a água era trocada e a alimentação feita com pequenos pedaços de peixe cru. Durante todo o período de realização do estudo, os animais apresentaram excelente adaptação.

Avaliação hematológica

Micro-hematócrito: para avaliar diferenças fisiológicas decorrentes do estado estival e não estival foi determinado o micro-hematócrito e realizadas as dosagens de hemoglobina e glicemia. Para estes procedimentos, seis peixes foram separados em dois grupos de três e identificados como E (Estival) e NE (Não Estival). A estivação foi realizada no mês de junho de 2004, no entanto, a cada dois meses os parâmetros citados acima foram avaliados e finalizados em dezembro de 2004. Amostras de sangue obtidas conforme procedimento descrito no capítulo de DaMatta et al. foram utilizadas para preenchimento de tubos capilares de 75 mm, e após centrifugação a leitura dos tubos capilares foi realizada em cartela padronizada, cujas divisões vão de 0 a 100, correspondendo às porcentagens que relacionam a quantidade de células compactadas com a parte líquida do sangue.

Hemoglobina: a hemoglobina foi determinada pelo método de cianeto de metahemoglobina conforme padronizado pelo Subcommittee on Hemoglobinometry of The International Committee for Standardization in Hematology (1964). Os experimentos foram realizados em triplicata e para sua realização, 20 μl de sangue total foram colocados em um tubo de ensaio contendo 5 mL de reagente de cor com a seguinte formulação: Fosfato de Potássio monobásico 0,1M, Ferrocianeto de Potássio 0,06M, Cianeto de Potássio 0,077M e Triton X-100 0,082M. A amostra foi homogeneizada, ficou em repouso por cinco minutos em temperatura ambiente e a seguir as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro em 540 nm. O zero do

aparelho foi ajustado com água destilada. O resultado quantitativo final da hemoglobina foi obtido multiplicando-se a absorbância obtida por um fator calculado através da leitura de 20 μl de uma solução padrão de concentração conhecida.

Análises bioquímicas

Níveis de glicemia sangüínea: experimentos para determinar a glicemia sanguínea foram realizados de acordo com Henry (1996). Amostras de sangue obtidas conforme procedimento descrito anteriormente foram centrifugadas a 300 g, durante 5 minutos e a 20 μl de plasma foi adicionado 2 mL de uma solução tampão de fosfato, pH 7,4 contendo glicose oxidase, peroxidase, 4-aminoantipirina e p-hidroxibenzoato. Em uma primeira etapa ocorreu a reação da glicose mais O_2 e H_2O, catalisada pela glicose oxidase formando ácido glicônico e H_2O_2. Em uma segunda etapa de reações o H_2O_2 reagiu com a 4-aminoantipirina em presença da peroxidase formando 4-antipirilquinomina e água. A 4-antipirilquinomina é de coloração avermelhada e sua intensidade é diretamente proporcional à concentração de glicose na solução. A cor avermelhada formada pela reação foi medida em espectrofotômetro com absorção máxima em 510 nm e as medidas de absorção foram registradas para cálculo da concentração de glicose na amostra. O resultado quantitativo final da glicose foi obtido multiplicando-se a absorbância obtida por um fator calculado através da leitura de 20 μl de uma solução padrão de concentração conhecida.

Níveis de glutationa: para o presente estudo, os níveis de glutationa total foram medidos de acordo com protocolo espectrofotométrico descrito por Anderson (1969). O nível de glutationa total consiste na mistura das formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) em sangue total fresco. Para obter essa medida, amostra de 2 mL de sangue foi colhida em um tubo contendo 100μl de EDTA (2mg/mL) e 10-fenantrolina (10mM) em solução salina 0,9%, para evitar a coagulação e a auto-oxidação, respectivamente. O nível de glutationa foi medido através de espectrofotômetro, com comprimento de onda de 412 nm. Uma curva-padrão com concentrações crescentes de glutationa (0, 3, 9, 15, 21 e 27 μM) foi construída como base para cálculo dos valores de absorbância das amostras. Do sangue total, foi diluída uma alíquota de 20μL em 980 μL de água destilada. A proteína presente na amostra foi desnaturada com adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 300 x g. Do sobrenadante, foi retirado 1 mL, ao qual foi acrescentado 1 mL de éter etílico para inativação do TCA. Após evaporação total do éter, a amostra foi diluída 100 vezes em Tampão PBS/EDTA (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, $Na_2HPO_4.7H_2O$ 4,3 mM, KH_2PO_4 1,4 mM, pH 7,2 – 7,4) e dosada de acordo com o protocolo seguinte: para cada amostra houve um branco (tubo sem a enzima Glutationa Redutase comercial). Foi colocado em um tubo 650 μl de Tampão PBS/EDTA, 100 μL de Glutationa Redutase 10U/mL, 50 μL de NADPH 4 mM. Após 20 minutos de reação, adicionou-se 100 μL de solução reveladora (DTNB 5 mM). A leitura foi feita após cinco minutos e os resultados apresentados em μg/mL.

Superóxido dismutase (SOD): para a realização destes experimentos as hemácias foram lavadas por centrifugação com NaCl 0,9% para a eliminação de outras células presentes. A atividade da enzima SOD foi determinada nas hemácias através de espectrofotometria, baseada na inibição da redução do Citocromo C, como descrito por McCord & Fridovwich (1969) com algumas modificações. Uma curva-padrão com a enzima comercial foi preparada, para a obtenção de um fator que permitisse calcular a atividade da enzima nas amostras. Cada amostra foi avaliada em triplicata, onde cada tubo contendo 2,8 mL de Tampão Fosfato/EDTA (K_2HPO_4 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,8); 100 µL de Citocromo C (0,3 mM); 100 µL de Hipoxantina (1,5 mM); 100 µL de Xantina Oxidase (56 mM) e 100 µL da amostra foi diluída (1:50 com água destilada) e lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 550nm, após 15 minutos em temperatura ambiente. Para a obtenção dos valores finais referentes à atividade enzimática procedeu-se também a medição da proteína pelo método de Lowry et al. (1951), considerando a não utilização de sangue total. Os resultados foram convertidos e apresentados em U/mL de sangue.

Resultados em *Lepidosiren paradoxa*

Durante toda a fase experimental os exemplares permaneceram em estado estival por períodos bastante longos, de até seis meses. Após o período de estivação, nos primeiros dias, os animais mostraram a cor da pele bastante clara. Quanto à readaptação, pouca mobilidade foi observada no início, a qual foi modificada logo após três ou quatro dias pós-estivação. Um fato interessante constatado foi a possibilidade de reprodução em cativeiro, onde no mês de setembro de 2005 foi detectada a presença de um filhote de *Lepidosiren* medindo aproximadamente 20 cm. Esta observação foi realizada na parte do tanque que continha água indicando reprodução em estado não estival. Não foi possível identificar todas as fases já que este resultado foi inesperado e causou grande surpresa.

A - Valores de hematócrito e hemoglobina de peixes em estados estival e não estival

Os valores do hematócrito e da hemoglobina mostraram que não houve alterações significativas quando foram comparados os animais de número 1, 2 e 3 em estado estival e não estival (Tabela 1).

Tabela 1. Valores do hematócrito e hemoglobina para indivíduos de *L. paradoxa* em estado estival (E) e não estival (NE), de junho a dezembro de 2004.

	Hematócrito (%)						Hemoglobina (g/dL)					
Meses	E1	NE1	E2	NE2	E3	NE3	E1	NE1	E2	NE2	E3	NE3
Junho	25	29	30	30	29	29	8,5	9,5	10	9,5	9	9,5
Agosto	26	31	33	34	32	28	8,5	10	11	11	10,6	9,4
Outubro	24	30	32	35	32	27	8	10	10,5	11,3	10	9,1
Dezembro	20	30	33	36	30	28	6,8	10,4	10,9	12	10,9	9,4

B - Níveis de glicemia de peixes em estados estival e não estival

A determinação da glicemia foi realizada nos peixes identificados como estivado e não estivado. Os peixes foram estivados no mês de junho e as determinações da glicemia foram realizadas nos meses de agosto, outubro e dezembro de 2004. Os peixes não estivados foram mantidos em áreas compartimentalizadas do tanque, em ambiente aquático. Os resultados mostraram que os peixes mantidos em estado não estival possuíam glicemia aproximadamente 100% maior do que os estivados (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de glicemia para indivíduos de *L. paradoxa* em estado estival (E) e não estival (NE), de agosto a dezembro de 2004.

	Glicemia (mg/dL)					
Meses	E1	NE1	E2	NE2	E3	NE3
Agosto	24,6	50,7	24,9	43,7	22	40,6
Outubro	25	52	24	44	22	43
Dezembro	25	50	21	46	23	40

C - Estresse Oxidativo: níveis de glutationa total

Os animais não estivados apresentaram níveis de glutationa total de 13971,7 ± 1067,7 µg/mL de sangue, que variou de 12781,3 a 15412,7 µg/ml, enquanto os níveis de glutationa total nos animais estivados foram de 8646,2 ± 348,0 µg/mL de sangue, com variação de 8082,3 a 9022,1 µg/ml, o que demonstrou diminuição em cerca de 40% nos animais estivados. Os níveis de glutationa nos dois grupos de animais foram significativamente diferentes ($p<0,0001$), como mostra a Figura 1.
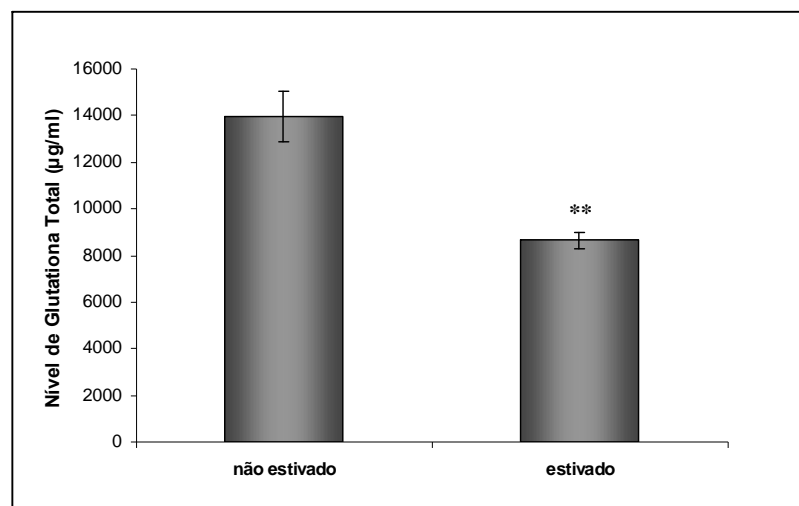
Figura 1. Níveis de glutationa total em amostras sanguíneas de *L.paradoxa* no estado não estival e estival. **$p<0,01$ (ANOVA, teste de Tukey). Valores expressam as médias ± desvio padrão.

D - Estresse Oxidativo: atividade da superóxido dismutase (SOD)

Os animais não-estivados apresentaram a atividade da SOD de 8,7 ± 1,06 U/mL com variação de 7,06 a 10,2 U/mL de sangue, enquanto que em animais estivados a atividade da enzima foi de 1,96 ± 0,70 U/mL, com variação de 0,93 a 2,95 U/mL de sangue. A atividade da SOD foi significativamente maior, cerca de 75%, em animais não-estivados (p<0,0001), quando comparados com animais estivados (Figura 2).
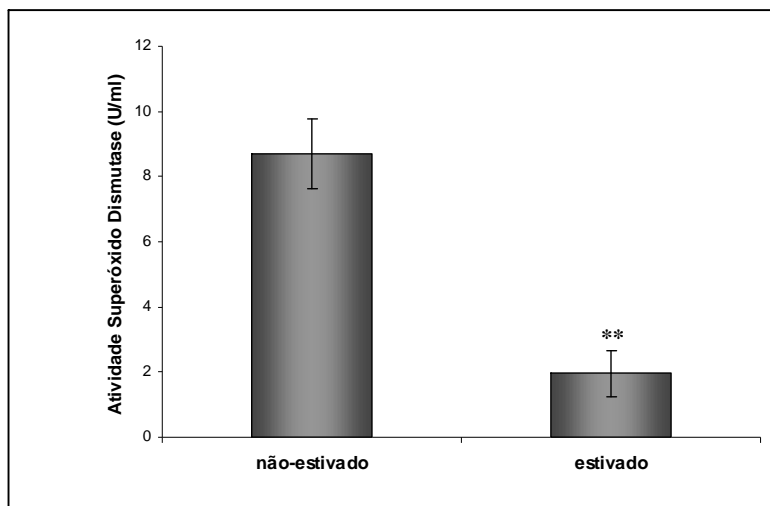
Figura 2. Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) em amostras sanguíneas de *Lepidosiren paradoxa* no estado não estival e estival. **p<0,01 (ANOVA, teste de Tukey). Valores expressam as médias ± desvio padrão.

Os peixes pulmonados possuem capacidade de estivação e apresentam extraordinária adaptação a este estágio. Durante a realização deste trabalho, observamos a permanência dos peixes em estado estival por períodos bastante longos, de até seis meses. Quando os animais saíram do período de estivação apresentaram nos primeiros dias a cor da pele bastante clara. Observamos também alta sensibilidade ao toque, que foi confirmada pela agressividade demonstrada quando manipulados. Quanto à readaptação, apresentavam pouca mobilidade inicial, no entanto esta situação se modificou após três ou quatro dias, quando os peixes voltaram a apresentar movimentação normal no ambiente aquático. Estas observações estão de acordo com as relatadas por Coelho & Sawaya (1972). Estes autores reportam que o *L. paradoxa*, na fase não estivada, apresenta o tegumento

quase negro e revestido de espessa camada de muco que cria dificuldade de contenção do animal durante as experiências. Após período de quatro meses de estivação, a pele do animal fica semitranslúcida e com pouco muco, diferindo totalmente do aspecto apresentado na fase não estivada. Ainda segundo Coelho & Sawaya (1972), logo após sair da estivação o animal se movimentava lentamente, só o fazendo com certa rapidez cinco dias depois.

Com relação aos parâmetros hematológicos uma importante característica desses peixes em condições de estivação é o fato de não apresentarem alterações na concentração de hemoglobina e hematócrito, mesmo após 1, 3 e 6 meses de estivação, porém os níveis glicêmicos caem metade nessas condições quando comparados aos animais não estivados. Consideramos este resultado previsível, tendo em vista que, em estado estival, os peixes restringem muito a ingestão de alimentos e, portanto, as fontes de glicose sanguínea também diminuem. É possível prever que nestas condições a provisão de glicose para o metabolismo energético seja originada de outras fontes como, por exemplo, a glicogênese e por fim a gliconeogênese. Alguns estudos referem que os estoques de glicogênio no músculo esquelético e cardíaco do peixe pulmonado são suficientes para fornecer energia durante os períodos de estivação (Almeida-Val & Hochachka, 1995). No entanto, é possível que em longos períodos de estivação induzida, o peixe utilize outra fonte geradora de glicose como a gliconeogênese. Novos estudos serão necessários para determinar as fontes de glicose no animal estivado.

Os resultados quanto aos parâmetros hematológicos e estresse fisiológico em *L. paradoxa* são parcialmente correlatos com os estudos feitos em esturjões *Acipenser brevirostrum* sob condições de estresse (Beyea et al., 2005). Este estudo mostra que, sob condições de estresse, o hematócrito encontra-se elevado, enquanto que as concentrações de hemoglobina e glicemia sanguínea não apresentam alterações. Nossas observações em *L. paradoxa* revelaram não haver alterações nos valores de hematócrito e concentração de hemoglobina quando comparamos estado estivado e não estivado. No entanto, os índices de glicemia sanguínea apresentaram-se significativamente mais baixos nos animais estivados. Este fato sugere que a resposta metabólica ao estresse induzido pode ser diferenciada dependendo da espécie e, provavelmente, das condições a que essas espécies são submetidas para induzir o estresse. No estudo realizado em esturjões, o estresse foi induzido por confinamento e exercício e por período de tempo menor do que o período de estivação da *L. paradoxa*, para que os parâmetros hematológicos e bioquímicos fossem avaliados. Estas variáveis provavelmente contribuem para alterações divergentes. Mesmo em se tratando de espécies e condições diferentes, é possível afirmar que condições de estresse alteram a resposta. É importante ainda considerar que diferentes espécies podem utilizar fontes alternativas de energia, como por exemplo, a utilização de ácidos graxos, preferencialmente a utilização da glicose, o que pode explicar a manutenção do nível de glicose sanguínea em algumas espécies como o esturjão.

Quando saem do estado de estivação induzida, os peixes apresentam movimentos lentos durante um curto período de tempo. É possível interpretar este fato relacionando à depressão metabólica. A principal evidência da ocorrência de depressão metabólica é a manutenção dos estoques de

glicogênio, acúmulo de lactato, mudanças na relação piruvato/lactato, mudança na concentração de adenilato e depleção da creatina fosfato no músculo durante estados de submersão (Dunn et al., 1983), e em resposta à anóxia (Lewis et al., 2007).

Na natureza, há várias situações em que ocorre grande variação na disponibilidade de oxigênio, devido a uma eventual falta de O_2 no ambiente ou como conseqüência de uma condição fisiológica. Para lidar com essas situações, os peixes pulmonados desenvolveram estratégias bioquímicas e fisiológicas de tolerância à anóxia. Entre esses processos está a depressão metabólica que se caracteriza por uma redução de 70% do metabolismo basal, onde o consumo de O_2 e a produção de calor são reduzidos em grande escala (Mesquita-Saad et al., 2002). Durante esses episódios, o metabolismo é mantido pelas reservas energéticas (glicogênio e/ou lipídios) acumuladas pelo animal. Alguns animais entram em depressão metabólica quando o ambiente fica extremamente desfavorável para sua sobrevivência, dificultando a obtenção de alimento ou mesmo de oxigênio. Os peixes pulmonados estão entre esses animais que, para sobreviverem, usam de estratégias conhecidas como estivação, em resposta a baixa disponibilidade de água no ambiente. Esses animais podem continuar usando o metabolismo aeróbico, mas em taxas reduzidas, e pode haver também baixa disponibilidade de oxigênio (hipóxia) nos seus órgãos internos (Mesquita-Saad et al., 2002).

Devido às características hematológicas do peixe pulmonado, com hemácias de grande tamanho e seu potencial oxirredutor, foi possível correlacionar essas características através de marcadores de estresse oxidativo, como é o caso da glutationa e superóxido dismutase (SOD), mantendo os peixes em condições de estivado e não estivado.

Nossos resultados favorecem a hipótese da depressão metabólica como consequência do estado estival, pois observamos alteração nas atividades da enzima SOD e também nos níveis de glutationa. Pode ser também que nessas condições, os níveis de radicais livres superóxido e de H_2O_2 estejam diminuídos e isto resulte em menos acoplamento dos mecanismos de defesas antioxidantes.

Encontramos níveis diferenciados de atividade da enzima SOD em *L. paradoxa,* comparativamente no estado estival e não estival, observamos que a atividade da enzima é significativamente elevada quando o animal encontra-se em estado não estival em relação ao estado estival. Da mesma forma como ocorreu com a enzima SOD também observamos níveis diminuídos da glutationa quando os peixes se encontravam em estado estival comparativamente aos que se encontravam em estado não estival. Estas observações reforçam a interpretação de um estado de depressão metabólica durante o estado estival como sugerido por Mesquita-Saad et al. (2002). Estes resultados podem também levar a hipóteses importantes.

Considerando estado estival e não estival, em relação ao *L. paradoxa,* observa-se que nas duas situações há captação de oxigênio. Se o peixe está estivado e não há substratos alimentares suficientes, mesmo havendo captação de oxigênio do meio, esta captação deve ocorrer em condições supostamente desfavoráveis, diminuindo, portanto, a possibilidade de geração de radicais livres. Como não há substratos alimentares é possível supor que esta situação regula o metabolismo oxidativo, pois muito embora

haja o aceptor de elétrons, a transferência dos mesmos na cadeia de transporte é mínima. Isto explicaria a diminuição na geração de radicais livres via cadeia de transporte de elétrons e ainda a diminuição na atividade da SOD e nos níveis da glutationa. Esses dados reforçam a premissa de que em condições de baixa oxigenação e baixo nível de combustível energético, esses animais desacoplam inúmeras reações químicas metabólicas. Essa hipótese está coerente com a redução da capacidade antioxidante frente às condições experimentais expostas.

Em determinados animais que toleram naturalmente processos de anóxia/hipóxia, alguns de seus sistemas enzimáticos de defesa antioxidante são aumentados ou mantidos elevados, como um preparo contra o estresse oxidativo. Mas a forma pela qual esses animais conseguem regular o aumento/manutenção da atividade de enzimas antioxidantes, num momento em que a disponibilidade de O_2 é baixa ou mínima (e, portanto, a geração de radicais livres é diminuída), permanece desconhecida. Uma hipótese plausível seria a de que o mesmo mecanismo molecular que percebe as flutuações de O_2 no meio poderia promover as alterações nas atividades de antioxidantes enzimáticos em condições de anóxia/hipóxia (Almeida-Val & Hochachka, 1995; Lewis et al., 2007; Gilmour et al., 2007).

Considerações finais

Comparando-se o estado estival e não estival pudemos detectar que quando o peixe encontra-se no primeiro estado há diminuição acentuada na atividade da enzima superóxido dismutase e nos níveis de glutationa, levando a crer que nesta situação o peixe encontra-se em estado de depressão metabólica. Investigações posteriores são também importantes para esclarecer melhor a capacidade de adaptação funcional desta espécie.

Agradecimentos

Ao Francisco C. da Silva por manter os peixes em cativeiro. Ao Manoel C. M. de Souza e Antonio Julio de O. Monteiro pela ajuda na contenção do peixe. Ao Dr. Ralph Lainson por ter permitido o uso do biotério de animais silvestres do Instituto Evandro Chagas. Ao Dr. Wanderley de Souza por ter sido, e continuar a ser, um grande incentivador e fomentador de pesquisas no Brasil com especial atenção ao Pará. Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT-CNPq) 620214/2006-6, Fundação de Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD), Universidade Federal do Pará (UFPA) e Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).

Referências

AHLBERG, P.E.; SMITH, M. M.; JOHANSON, Z. 2006. Developmental plasticity and disparity in early dipnoan (lungfish) dentitions. *Evol. Dev*., 8(4): 331-349.

ALMEIDA-VAL, V. M. F.; HOCHACHKA, P. W. 1995. Air-breathing fishes: metabolic biochemistry of the first diving vertebrates. In: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN; T. (Ed.). *Biochemistry and molecular biology of fishes, environmental and ecological biochemistry*. Amsterdan: Elservier Sciense, p. 44-45.

BAE, Y. S.; KANG, S. W.; SEO, M. S. 1997. Epidermal growth factor (EGF) – induced generation of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, 272:217-221.

BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the responses and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 1:3-26.

BAUR, G. 1908. Uber *Lepidosiren paradoxa* Fitzinger. *Zool. Jb. System. Okol. Geograph.*, 2:275-582.

BEAUDEUX, J. L.; GARDES-ALBERT, M.; DELATTRE, J.; LEGRAND, A.; ROUSSELET, F.; PEYNET, J. 1996. Resistance of lipoprotein (a) to lipid peroxidation inducedby oxygenated free radicals produced by gamma radiolysis: a comparison with low density lipoprotein. *Biochem. J.*, 314:277-284.

BEMIS, W. E.; FINDEIS, E. K.; GRANDE, L. 1997. An overview of Arcipenseriformes. *Environ. Biol. Fish.*, 48:25-71.

BEYEA, M. M.; BENFEY, T. J.; KIEFFER, J. D. 2005. Hematology and stress physiology of juvenile diploid and triploid shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 31:303-313.

BISCHOFF, M. 1840. Description anatomique du *Lepidosiren paradoxa*. *Ann. Sci. Nat. Sêr II*, 14:116-159.

BRIEN, P.; BOUILLON, J. 1959. Les sacs gaseux du Protoptère et phylogénie des poumons. C. R. *Acad. Sc. Paris.*, 248:2049 – UP.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. 2006. Bioquímica Ilustrada. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, p. 144-154.

CHOPRA, S.; WALLACE, H. M. 1998. Induction of spermidine/spermine N1-acetiltransferase in human cancer cells in response to increased production of reactive oxygen species. *Biochem. Pharmacol.*, 55:1119-1123.

CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. 1992. The concepts of stress and stress systems disorders. Overview of physical and behavioural homeostasis. *J. Am. Med. Assoc.*, 267:1244-1252.

COELHO, L. M. P. S.; SAWAYA, P. 1972. Fisioecologia de tambaqui m'boya- *Lepidosiren paradoxa* - da Amazônia (Peixe Dipnóico) - Estrutura do Tegumento. *Bol. Zool. Biol. Marinha*, *N. S.*, 29:65-118.

DO NASCIMENTO, J. L. M.; OLIVEIRA, K. R.; CRESPO-LOPEZ, M. E.; MACCHI, B. M.; MAUÉS, L. A.; PINHEIRO, M. C. N.; SILVEIRA, L. C. L.; HERCULANO, A. M. 2008. Methylmercury neurotoxicity & antioxidant defenses. *Indian J. Med Res.*, 128(4): 373-382.

DUNN, J. F.; HOCHACHKA, P. W.; DAVINSON, W.; GUPPY, M. 1983. Metabolic adjustments to diving and recovery in the African lungfish. *Am. J. Physiol.*, 245:651-657.

FREEMAN, B. A.; CRAPO, J. D. 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, 47:412-426.

GHOSH, J.; MYERS, C. E. 1998. Inhibition of arachidonate 5-lipoxigenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:13182-13187.

GILMOUR, K. M.; EUVERMAN, R. M.; ESBAUGH, A. J.; KENNEY, L.; CHEW, S. F.; IP, Y. K. 2007. Mechanisms of acid-base regulation in the African lungfish Protopterus annectens. *J. Experim. Biol.*, 210:1954-1959.

GOEDE, R. W.; BARTON, B. A. 1990. Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish. *Am. Fish Soc Symp.*, 8:93-108.

GOELDI, E. A. 1898. On the Lepidosiren of the Amazons: being of five Specimens obtained between 1895-1897 and remarks upon an example in the Pará Museum. *Trans. Zool. Soc. Lond.*, 14: 413-420, t. XXXVII-XXXVIII.

HENRY, J. B. 1996. Clinical diagnosis and management by laboratory methods, 19. ed. 194-207, 423-426.

HOCHACKA, P. W. 1980. *Living without oxygen*. Cambridge: Harvard University Press.

HOCHACKA, P. W.; GUPPY, M. 1987. *Metabolic arrest and control of biological time*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.

HURST, R.; BAO, Y.; JEMTH, P.; MANNERVICK, B.; WILLIAMSON, G. 1997. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of rat class Theta glutathione transferase T2-2. *Biochem. Soc. Trans.*, 25:S559-UP.

JARDINE, W. 1841. Remarks on the structure and habits of *Lepidosiren annectens*. *Ann. Nat. History*, 7:21-26.

JORNOT, L.; PETERSEN, H.; JUNOD, A. F. 1998. Hydrogen peroxide-induced DNA damage in independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions. *Biochem. J.*, 335:85-94.

KURATA, M.; SUZUKI, M.; TAKEDA, K. 1993. Differences in levels of erytrocyte glutathione and its metabolizing enzyme activities among primates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104:169-170.

LANKESTER, E. R. 1896. On the Lepidosiren of Paraguay, and on the external characters of *Lepidosiren* and *Protopterus*. *Trans. Zool. Soc. Lond.*, 14:11-24.

LEE, Y. J.; GALOFORO, S. S.; BERNS, C. M. 1998. Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in mitogen-activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 273:5294-5299.

LEWIS, J. M.; COSTA, I.; VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; GAMPERL, A. K.; DRIEDZIC, W. R. 2007. Responses to hypoxia and recovery: repayment of oxygen debt is not associated with compensatory protein synthesis in the Amazonian cichlid. *Astronotus ocellatus*. *J. Experim. Biol.*, 210:1935-1943.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*., 193 (1): 265-275.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. 1969. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. In: Radicals generated by the interaction with sulfite, dimethylsulfoxide and oxygen. *J. Biol. Chem.*, 244:6056-6063.

MESQUITA-SAAD, L. S. B.; LEITÃO, M. A. B.; PAULA-SILVA, M. N.; CHIPPARI-GOMES, A. R.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. 2002. Specialized metabolism and biochemical suppression during aestivation of the extant south american lungfish. *Braz. J. Biol.*, 62:495-501.

MILLS E. M.; TAKEDA, K.; YU, Z. X. 1998. Nerve growth factor treatment prevents the increase in superoxide produced by epidermal growth factor in PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, 278:22165-22168.

MIMURA, O. M.; SAWAYA, P. 1977. O pâncreas de *Lepidosiren paradoxa* (Fitz, 1836) nas fases aquática e estival. *Bol. Fisiologia Animal da Univ. São Paulo*, 1:79-90.

NELSON, J. S. 1984. Fishes of the world. 2. ed. New York: Wiley Interscience.

OBA, E. T.; MARIANO, W. S.; SANTOS, L. R. B. 2009. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. In: TAVARES-DIAS, M. (Org). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá, p. 226-247.

PÉREZ - GONZALEZ, M. D.; GRINKRAUT, C. N. 1971. Comportamento e metabolismo respiratório de *Lepidosiren paradoxa* durante a vida aquática e em estivação. *Bol. Zool e Biol. Mar. N. S.*, 28:137-164.

PICKERING, A. D. 1990. Stress and the suppression of somatic growth in teleost fish. In: EPPLE, A.; SCANES, C. G.; STETSON, M. H. (Ed.). *Progress in Comparative Endocrinology*. New York: Wiley-Liss, p. 473-479.

SHINOMIYA, N. 1970. *Biologia da Tambaki-M'boya - Lepidosiren paradoxa (Fitz, 1836) peixe dipnóico e metabolismo da glicose*. 78 f.Tese (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

STAIT, S. E.; LEAKE, D. S. 1996. The effects of ascorbate and dehydroascorbate on the oxidation of low density lipoprotein. *Biochem. J.*, 320:373-381.

STRYER, L. 1996. *Bioquímica*. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, xx p.

URSIN, H.; OLFF, M. 1993. The stress response. In: STANFORD, S. C. (Ed.). *Stress. From synapse to Syndrome*. London: Academic, p. 3-32.

WEDEMEYER, G. A.; BARTON, B. A.; Mc LEAY, D. J. 1990. Stress and acclimation. In: SCHRECK, C. B.; MOYLE, P. B. (Ed*.). Methods for fish Biology*. Bethesda, MD: American Fisheries Society, 451 - 489.

WEISER, W.; LACKNER, R.; HINTERLETNER, S.; PLATZER, U. 1987. Distribution and properties of lactate dehydrogenase isozymes in red and white muscle of freshwater fish. *Fish Physiol. Biochem*., 3:151-162.

WOJTASZEK, P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.*, 322:681-692.

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 12

Caracterização morfológica e funcional de leucócitos de peixes

Renato Augusto DaMatta, Maria Lucia da Silva Ribeiro, Tecia Maria Ulisses de Carvalho & José Luiz Martins do Nascimento

Resumo
Caracterizar leucócitos de peixe é crucial para desenvolver o diagnóstico hematológico e gerar conhecimentos básicos para entender a diversidade morfológica dessas células. Essa caracterização não é trivial e necessita de estudo morfológico e ensaio funcional. A caracterização dos leucócitos do peixe pulmonado da Amazônia Lepidosiren paradoxa é um bom exemplo da complexidade desse tipo de estudo que será apresentado aqui. Linfócitos, trombócitos e monócitos típicos de vertebrados foram observados em extensões sanguíneas desse peixe. Linfócitos e monócitos são parecidos, mas os últimos apresentam núcleo riniforme e maior relação citoplasma/núcleo. Trombócitos foram observados em grumos com citoplasma rosado e núcleo basofílico. Três tipos de granulócitos foram observados. O tipo I apresentou núcleo riniforme ou bilobulado, citoplasma contendo grânulos eosinofílicos, esparsos e distribuídos homogeneamente. O tipo II apresentou núcleo azulado e pequeno, citoplasma hialino com grande quantidade de grânulos eosinofílicos. O tipo III apresentou núcleo volumoso, com grânulos basofílicos, espalhados pelo citoplasma e sobre o núcleo. Outro tipo de leucócito encontrado foi denominado de polimorfo-agranulocítico e continha núcleo polimorfonuclear basofílico sem grânulo evidente. Esse leucócito tinha estruturas PAS-positivas; a microscopia eletrônica de transmissão confirmou a morfologia do núcleo e a pouca quantidade de grânulos. A contagem diferencial mostrou granulócito tipo II como o mais abundante, seguido de linfócitos, granulócito tipo I, monócito, polimorfo-agranulocítico e o granulócito tipo III. Como ensaio funcional usou-se a indução de inflamação estéril com inóculo de solução de tioglicolato na cavidade celômica. Observou-se a migração de um leucócito predominante com polimorfia nuclear, tamanho, distribuição e coloração de grânulos similares aos granulócitos tipo II do sangue. Em menor número foi observado o polimorfo-

agranulocítico e macrófagos. Esses dados indicam que o granulócito tipo II do sangue é funcionalmente equivalente ao neutrófilo humano. O granulócito tipo II deve ser equivalente ao eosinófilo de mamíferos e o tipo III pode ser o basófilo típico encontrado em vertebrados. Conclui-se que o ensaio funcional é importante para melhor caracterizar leucócitos do sangue de vertebrados.

Abstract

Fish leukocyte characterization is crucial for the development of hematological diagnosis, and generation of basic knowledge of the morphological diversity of these cells. This characterization is not trivial and needs a morphological study and also functional assays. The characterization of the Amazonian lung fish (Lepidosiren paradoxa) is a good example of the complexity that this type of work and are presented here. Typical lymphocytes, thrombocytes and monocytes were observed in blood smears of this fish. Lymphocytes and monocytes are a like, but the later have a rinifor nucleus and a greater cytoplasm nucleus ratio. Thrombocytes were observed in packs, with pink cytoplasm and basophilic nucleus. Three types of granulocytes were seen. Type I possessed riniform or bilobulated nucleus, cytoplasm containing not so many eosinophylic granules distributed homogenously through the cytoplasm. Type II had blue small nucleus, hyaline cytoplasm with many eosinophylic granules. Type III had a basophilic nucleus with many basophilic granules on top of the nucleus. Another type of leukocyte was an agranulocyte with basophilic polymorph nucleus. This leukocyte had no evident granules, with PAS-positive structures; transmission electron microscopy confirmed the morphology of the nucleus and the existence of very few granules. The differential scoring of leukocytes reveled that type II granulocytes was the most abundant cell in blood followed by lymphocytes, type I granulocyte, monocyte, polymorphonuclear agranulocytes and type III granulocyte. As a functional assay, a sterile inflammation was induced with the injection of thioglycollate solution at the coelomic cavity. It was observed the migration of a cell type with polymorphous nucleus, and size, distribution and staining similar to the blood type II granulocyte. In less number the agranulocytic polymorph and macrophages were observed. These data indicate that blood type II granulocyte is equivalent to the functional human neutrophil. Type II granulocyte may be the equivalent of the mammal eosinophil and type III may be the vertebrate basophil found in vertebrates. In conclusion, a functional assay is important to better characterize blood leukocyte of vertebrates.

Introdução

O sangue é um tecido conjuntivo líquido formado de plasma e células (Junqueira & Carneiro, 2004). As células sanguíneas são divididas em vermelhas (eritrócitos) e brancas (leucócitos). A origem desses nomes deriva da cor avermelhada do eritrócito e esbranquiçada da fina camada do conjunto de células formada logo acima dos eritrócitos, após centrifugação. Com o surgimento e desenvolvimento do microscópio óptico foi possível observar individualmente e, portanto, estudar as células do sangue. Este estudo é conhecido como hematologia e tem importância crucial para o diagnóstico de

doenças infecciosas, patologias como leucemias e avaliação do estresse (Garcia-Navarro & Pachaly, 2005).

As primeiras observações das células vermelhas do sangue foram realizadas por Jan Swammerdam em 1658 (Hajdu, 2003). Antoni van Leeuwenhoek, um de seus discípulos, descreveu o tamanho e forma de células vermelhas e fez a primeira ilustração datada de 1695 (Hajdu 2003). Ainda neste período, mais precisamente em 1682, Leeuwenhoek fez a primeira observação do núcleo de células, curiosamente, observando eritrócitos do sangue de peixes (Leeuwenhoek, 1682 apud Harris, 2000). Leeuwenhoek também descreveu a cor avermelhada das células, com a clara afirmativa de que a cor era evidente quando algumas células se agregavam; podendo-se concluir que a cor do sangue derivava das células que o compunham (Harris, 2000). Portanto, um dos primeiros registros morfológicos de células incluindo a primeira observação de núcleo foi realizado no sangue de peixe.

Neste primeiro momento, os leucócitos não foram observados, pois representam menos de 1% das células do sangue. A primeira descrição dessas células se deu simultaneamente em 1843 por dois pesquisadores que observaram que doenças alteravam o número e a morfologia dessas células (Hajdu, 2003). Nesta mesma época foi observado que no pus existiam leucócitos. Em meados de 1800 as fundações da hematologia foram estabelecidas (Hajdu, 2003). Em 1879 Paul Ehrlich desenvolveu corantes para diferenciar células em tecidos e os aplicou em extensões sanguíneas, iniciando a classificação dos diferentes tipos de leucócitos (Mitchell, 2009). Dimitri Romanowsky, Louis Jenner, Gustav Giemsa e James Wright aperfeiçoaram os corantes desenvolvidos por Paul Ehrlich e a classificação dos leucócitos foi mais além (Venita, 2009).

Hoje usamos em técnicas de rotina as colorações estabelecidas por esses pioneiros para observar a morfologia e quantificar a relação dos diferentes tipos celulares de leucócitos, dessa forma obtêm-se informações cruciais para diagnóstico dos diferentes vertebrados. Sabe-se bem sobre a morfologia e coloração de leucócitos de vertebrados com interesse médico e veterinário (seres humanos e animais de importância econômica e afetiva). No entanto, a classificação dos leucócitos de animais não domésticos (silvestres) não é trivial. Apesar da primeira observação do núcleo da célula ter sido feita no sangue de peixe (Leeuwenhoek, 1682 apud Harris, 2000), devido ao grande número de espécies de teleósteos (Finn & Kristoffersen, 2007), relativamente pouco se sabe sobre a classificação e morfologia dos leucócitos de peixes. Em suma, as células sangüíneas de peixes não possuem ainda uma classificação universal definida, apesar de existirem estudos que tentam sistematizar essa classificação (Ellis, 1977; Bielek, 1981; Meseguer et al. 1994; Tavares & Moraes, 2004). Ademais, a coloração de leucócitos após uso de corantes tradicionais não gera necessariamente células com morfologia idêntica as já descritas em outras espécies. Portanto, se faz necessário correlacionar morfologia (após coloração) com funcionalidade o que é um dos objetivos desse capítulo. Com a potencialidade econômica da piscicultura existe a clara necessidade de se entender os leucócitos de peixes para o conhecimento básico, estudos fisiológicos e filogenéticos e aplicação em diagnóstico.

De maneira geral, os leucócitos são divididos em dois grupos: granulócitos e agranulócitos. A existência de grânulos, sua forma e capacidade de se corar com os corantes convencionais têm sido explorados para separar os granulócitos nas três categorias tradicionais nomeadas por Paul Ehrlich: neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Esses nomes são derivados das cores assumidas por grânulos dessas células em sangue de humanos: neutrófilos (coloração neutra), eosinófilos (coloração eosinofílica) e basófilos (coloração basofílica). É um erro bastante comum associar a coloração dos grânulos de leucócitos de animais com hematologia pouco conhecida com os nomes já estabelecidos para granulócitos de humanos. Associando o tamanho da célula com a morfologia do núcleo e a coloração dos elementos citoplasmáticos cria-se, com algumas observações, uma nomenclatura dos leucócitos que pode ser equivocada. Não é raro observar em sangue de várias espécies de vertebrados, células somente com grânulos eosinofílicos (grânulos que se coram vermelho/alaranjado). Interpreta-se esse fenômeno como se não houvesse neutrófilos nessa espécie. No entanto, a função do neutrófilo é essencial, pois essa célula responde migrando rapidamente para tecidos inflamados iniciando, a resposta imunológica celular (Pinheiro da Silva & Soriano, 2009). O fato de um neutrófilo com características morfológicas humanas não ser observado não significa que o vertebrado em questão não tem um tipo celular com a função do neutrófilo humano. É de se esperar que algum tipo celular presente nesse vertebrado, provavelmente um granulócito, realize a função do neutrófilo humano na imunidade inata. Portanto, para se classificar leucócitos é essencial ter em mente que a coloração típica obtida com os corantes convencionais tem que ser usada com cautela e deve ser interpretada em conjunto com outros resultados, como: a contagem diferencial (obtendo a proporção dos diferentes tipos celulares), testes de funcionalidade (migração para tecidos inflamados) e comportamento em cultivo. Como exemplo da dificuldade de se caracterizar leucócitos de vertebrados, esse capítulo descreve a caracterização dos leucócitos do peixe pulmonado da Amazônia, já publicada (Ribeiro et al., 2007), adicionando resultados inéditos na literatura. Esse capítulo discute não somente a interpretação dos resultados mostrados, mas também a importância de se fazer o máximo de caracterização funcional para se melhor entender e classificar leucócitos. Um dos aspectos interessantíssimos desse vertebrado é que é considerado um “elo perdido” entre peixes e anfíbios. Portanto, esse peixe pode ter leucócitos presentes nos primeiros vertebrados que fizeram a transição da água para a terra. O estudo correlaciona morfologia com função no peixe pulmonado possibilitando o entendimento da evolução dos leucócitos de vertebrados. O capítulo caracteriza os leucócitos mostrando heterogeneidade nos granulócitos eosinofílicos, demonstra, por ensaio funcional, quem é o granulócito inflamatório e caracteriza um tipo celular bastante curioso no sangue de vertebrados.

Métodos para estudos de células sanguíneas e exsudato inflamatório de peixes

*Peixe*s

Espécimes do peixe pulmonado *Lepidosiren paradoxa* foram adquiridos de pescadores que os capturaram nas baixadas e alagados nos arredores de Belém, PA. Os animais foram mantidos em um tanque medindo 150 cm de comprimento, 75 cm de largura e 60 cm de profundidade; com troca semanal da água. Os peixes foram alimentados com pequenos pedaços de peixe cru uma vez por semana.

Obtenção do sangue e colorações

Os peixes foram acondicionados em gaiolas usadas para camundongos contendo chumaço de algodão embebido em éter etílico. Após 5 min os peixes foram contidos na mão e o sangue obtido por punção cardíaca com seringa de 3 mL e agulha de 25 x 7. Cem μL de EDTA (anticoagulante) a 10% em PBS foi adicionado em tubo de ensaio antes da adição de 2 mL do sangue colhido do peixe. As extensões sanguíneas foram preparadas, secas no ar e fixadas de acordo com as seguintes técnicas de coloração:
Giemsa: as extensões sanguíneas foram fixadas com álcool metílico durante 4 min. Após esse tempo as extensões foram imersas em solução diluída de Giemsa (1 gota do corante de Giemsa comercial em 1 mL de água destilada) por 45 min. As extensões foram lavados em água corrente e secos ao ar.
Leishman: as extensões sanguíneas receberam 20 gotas do corante de Leishman por 3 min. Após esse tempo, 20 gotas de água destilada foram colocadas sobre o corante de Leishman. Após 14 min estas extensões foram lavadas em água corrente e deixadas secar ao ar.
Método do ácido periódico de Schiff (PAS): as extensões sanguíneas foram fixadas com líquido de Gendre (solução etílica saturada de ácido pícrico 80 mL, formol 15 mL, ácido acético glacial 5 mL) gelado por 10 min, lavadas em água corrente, imersas em solução aquosa de ácido periódico a 1% por 15 min, lavadas e tratadas no reativo de Schiff (fucsina básica 1,0 g, água destilada 400 mL, metabissulfito de sódio 9,0 g, ácido clorídrico 1N 10 mL, carvão ativado 7,0 g para 100 mL). Após 45 min, extensões foram lavadas em água sulfurosa (ácido clorídrico 1N 10 mL, metabissulfito de sódio a 10% 10 mL, água destilada 180 mL) e lavadas em água destilada durante 10 min, depois foram coradas com Hematoxilina de Harris durante 2 min, lavadas durante 10 min em água corrente e secas ao ar.

Separação de leucócitos dos eritrócitos

O sangue foi adicionado em tubo de caneta esferográfica transparente virgem (Bic®). Uma das extremidades do tubo foi lacrada com a colocação de duas bilhas de metal um pouco maior que o diâmetro do tubo. O tubo foi acondicionado em um tubo de vidro convencional e centrifugado por 10 min a 500 g, em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o tubo foi observado em um esteriomicroscópio, o menisco entre os leucócitos e plasma foi localizado e cortado com gilete convencional. Logo em seguida, a parte do

tubo contendo os leucócitos foi pinçada e o menisco leucócito-eritrócito cortado. A região do tubo contendo os leucócitos (geralmente em torno de 2 mm) teve seu interior lavado com um volume de 200 μL de PBS usando pipeta Pasteur em uma placa de Petri (Silva et al., 2004). Esse procedimento garante a obtenção de leucócitos concentrados razoavelmente livres de eritrócitos e, portanto, de fácil observação na microscopia eletrônica de transmissão.

Lavado celômico de peixe

Uma das formas de se determinar qual é o leucócito que primeiro migra para tecidos inflamados é através da indução de inflamação estéril na cavidade celômica dos peixes (Pimpão et al., 2008). Este procedimento foi realizado em 3 peixes pulmonados com a inoculação de 1 mL de solução aquosa de tioglicolato a 3% na cavidade celômica. Após 6, 12 e 48 h, os peixes foram sacrificados e a cavidade celômica foi lavada através da inoculação de 10 mL de meio Dulbecco's modificado de Eagles. Sem remoção do tegumento do peixe, o máximo de volume de meio (8-9 mL), contendo a suspensão de células que migraram para a cavidade inflamada, foi sugado com a mesma seringa. Com essa suspensão celular foram realizados extensões em lâminas seguindo o mesmo procedimento do sangue. Uma sugestão para a realização da técnica da extensão de células em suspensão salina é a adição de 30% a 10% de soro fetal bovino comercial (usado em cultura de células) na suspensão, melhorando o espalhamento das células. Outro procedimento importante antes de se fazer o lavado celômico é conhecer bem a anatomia do peixe em estudo. Alguns exemplares devem ser usados somente para se treinar a técnica do lavado.

Microscopia óptica

As extensões sanguíneas foram observadas e fotografadas em microscópio Zeiss Axiophot usando objetiva de 100x (imersão a óleo). A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada neste mesmo microscópio contando, 100 leucócitos por cada extensão sanguínea de 10 peixes.

Microscopia eletrônica de transmissão

Os leucócitos do sangue recém obtidos pela técnica de centrifugação foram fixados em 2,5% de glutaraldeido, 4% de paraformaldeido recém-preparado em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2. Após 2 h em temperatura ambiente, as células foram lavadas e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% contendo 0,8% de ferrocianeto de potássio, 5 mM de cloreto de cálcio em tampão cacodilato. Após 1 h, as células foram lavadas por centrifugação e imersas em solução de acetato de uranila a 2,5% em acetona a 25%. A pós 1 h, foi realizada a desidratação em soluções crescentes de acetona, infiltração em resina epóxi (PolyBed) e polimerização em estufa a 60ºC por 48 h. Secções ultrafinas (60 nm) foram obtidas em ultramicrótomo Ultracut S Reichert com navalha de diamante, recolhidas em grades de cobre, contrastadas com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo e observadas

ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900 do Instituto Evandro Chagas (UFRJ).

Resultados em piramboia *Lepidosiren paradoxa*

A observação das extensões sanguíneas revelou linfócitos, trombócitos e monócitos típicos de vertebrados (Figuras 1A, B, C). Linfócitos apresentaram pouco citoplasma de cor púrpura clara, com núcleo basofílico com grande densidade (Figura 1A). Monócitos eram maiores que linfócitos contendo bem mais citoplasma e núcleo riniforme (Figura 1B). Trombócitos foram geralmente observados em grumos com um formato elipsóide, contendo citoplasma rosado com quantidade intermediária entre linfócitos e monócitos, e núcleo bastante basofílico (Figura 1C). Três tipos de granulócitos foram observados e denominados de tipo I, II e III (Figuras 1D, E, F). O tipo I apresentou núcleo riniforme de cor azul-clara, citoplasma levemente basofílico contendo grânulos eosinofílicos e esparsos, mas distribuídos homogeneamente pelo citoplasma, o núcleo era geralmente bilobulado com alguns exemplares tendo núcleo trilobulado (Figura 1D). O tipo II apresentou núcleo relativamente pequeno, citoplasma hialino contendo grande quantidade de grânulos eosinofílicos e núcleo excêntrico azulado (Figura 1E). O tipo III apresentou núcleo volumoso bem basofílico com grânulos também basofílicos esparsos pelo citoplasma e sobre o núcleo (Figura 1F).

Outro tipo de leucócito bastante intrigante achado comumente nesse peixe foi denominado de polimorfo-agranulocítico (Figura 2). Essa célula apresentou inconfundível núcleo polimorfonuclear basofílico, sem grânulo evidente (Figura 2A). Estruturas PAS positivas foram observadas nessa célula (Figura 2B). A observação pela microscopia eletrônica de transmissão confirmou o núcleo polimorfonuclear e a pouca quantidade de grânulos (Figura 2C).
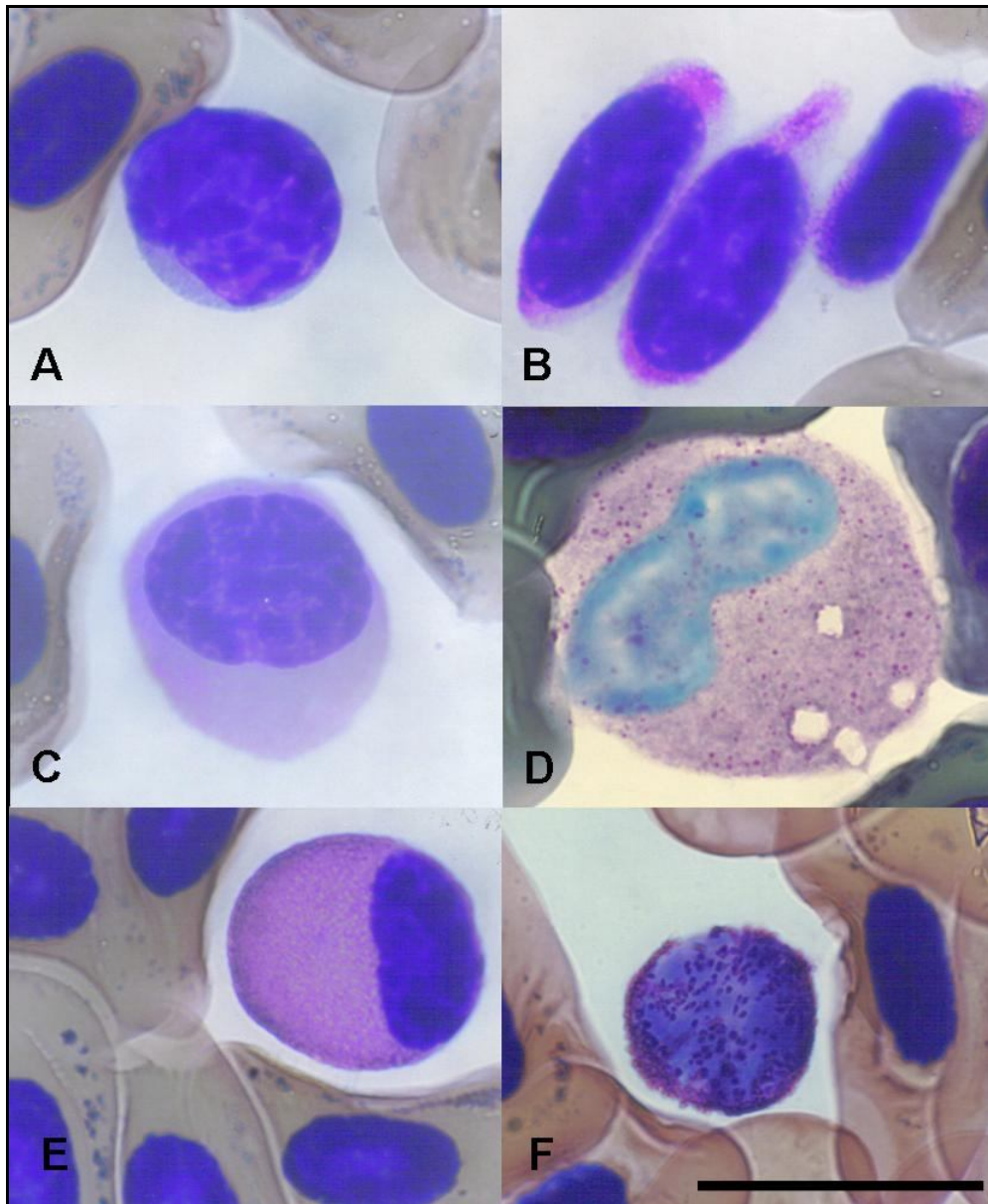
Figura 1. Leucócitos do sangue periférico de *L. paradoxa* observados em campo claro. (**A**) Linfócito apresentando núcleo volumoso, discreta chanfradura lateral e pequena área de citoplasma. (**B**) Trombócitos agregados. Célula de forma ovalada citoplasma como fina faixa apresentando poucas granulações, núcleo intensamente corado acompanhando a forma da célula. (**C**) Monócito apresentando núcleo riniforme e citoplasma cinza-azulado. (**D**) Granulócito tipo I com núcleo excêntrico bilobulado, e citoplasma com grânulos eosinofílicos distribuídos de forma homogênea. (**E**) Granulócito tipo II apresentando núcleo excêntrico e citoplasma repleto de grânulos eosinofílicos. (**F**) Granulócito tipo III com grânulos basofílicos distribuídos de forma homogênea no citoplasma e recobrindo o núcleo. Coloração Leishman (A, B, D, E, F). Coloração Giemsa (C). Barra = 30 μm.
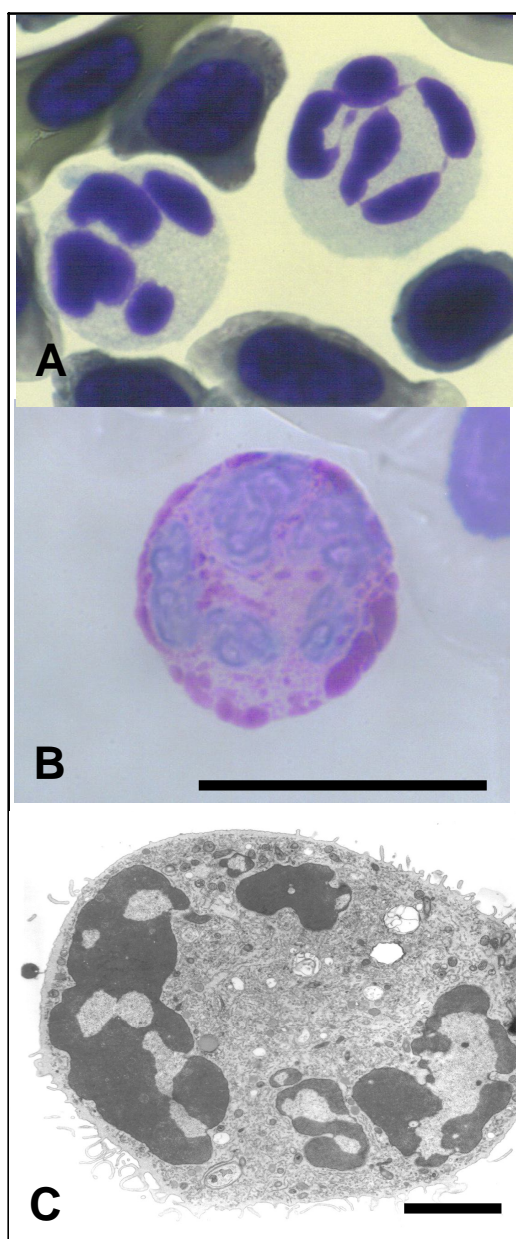
Figura 2. Polimorfo-agranulocíticos do sangue periférico de *L. paradoxa* observados em campo claro (A e B) e por microscopia eletrônica de trasmissão (C). (**A**) Polimorfo-agranulocítico com núcleo polimorfonuclear. Coloração Giemsa. (**B**) Polimorfo-agranulocítico com regiões PAS-positivas mais concentradas na periferia da célula. (**C**) Polimorfo-agranulocítico. Observar núcleo polilobulado, presença de mitocôndrias e ausência de grânulos. Barra = 30 μm para A e B, = 5μm para C.

Após essa classificação histomorfológica foi realizada a contagem diferencial dos leucócitos obtendo os seguintes resultados: granulócito tipo II foi a população mais frequente (34,7 ± 6,53%), seguido pelos linfócitos (23,3 ± 5,07%), granulócito tipo I (17,8 ± 4,48%), monócito (12,2 ± 2,53%), polimorfo-agranulocítico (10,2 ± 3,11%) e o granulócito tipo III (1,8 ± 0,98%).

A análise por microscopia óptica do lavado peritoneal do peixe pulmonado revelou a presença predominante de um tipo celular com a

mesma polimorfia nuclear observada em granulócitos tipo II do sangue (Figura 3). Tamanho, distribuição e coloração de grânulos também foram similar ao granulócitos tipo II do sangue (Figura 3). Em uma contagem preliminar foi possível confirmar a predominância desse tipo celular no lavado celômico (Tabela 1). Tanto o polimorfo-agranulocítico como macrófagos foram também observadas no lavado (não mostrado). A contagem revelou maior número do polimorfo-agranulocítico do que de macrófagos (Tabela 1). Não houve diferença significativa dos tipos celulares entre os 3 tempos de estímulo com tioglicolato analisados neste estudo (Tabela 1).
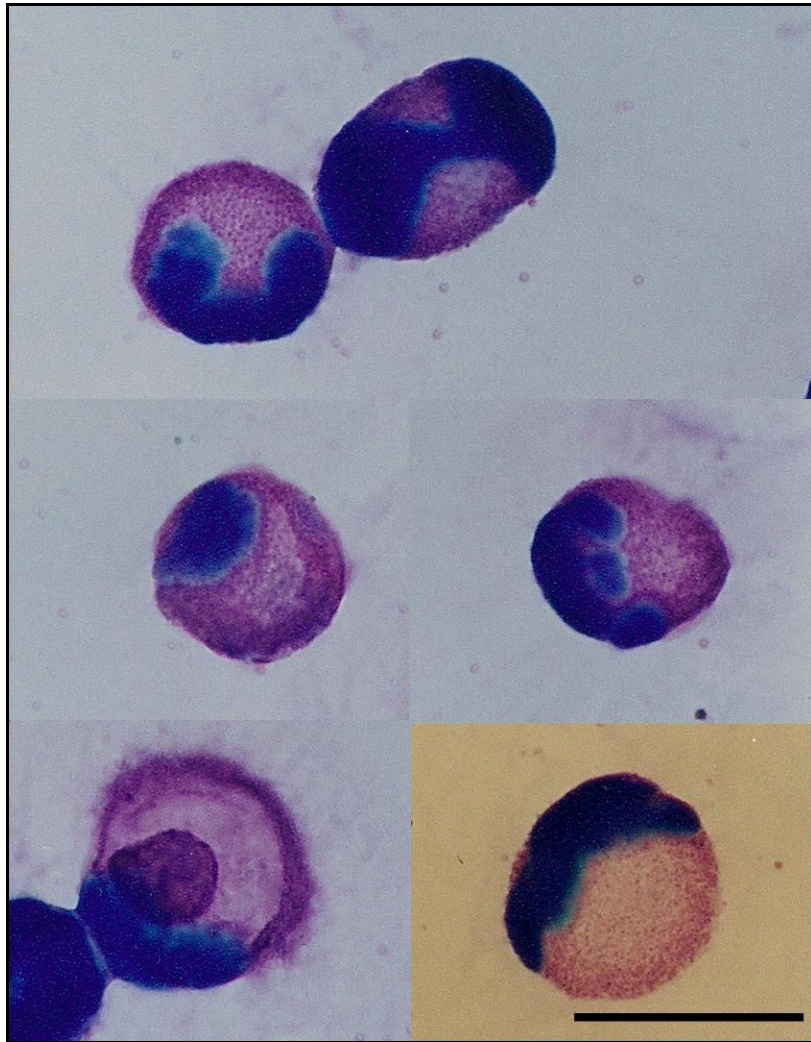
Figura 3. Granulócito inflamatório obtido do lavado celômico de *L. paradoxa* observados em campo claro. Vários exemplos do granulócito inflamatório obtido após 12 h de estímulo inflamatório com solução de tioglicolato a 3%. Note similaridade dessas células ao granulócito tipo II observado no sangue (veja a Figura 1 E). As células foram coradas com Giemsa, exceto a da direita abaixo que é com Leishman.

Tabela 1. Porcentual (%) dos tipos celulares presentes no lavado celômico em *L. paradoxa* após 6, 12 e 48 h do estímulo inflamatório.

Tempo de estímulo (horas)	Granulócito tipo II	Polimorfo-agranulocítico	Macrófago
6	87	9	4
36	85	12	3
48	84	10	6

Caracterizar os tipos de leucócitos de espécies de peixes é de suma importância para o entendimento básico dessas células. Essa informação é crucial para compreender o sistema imunológico e desenvolver tecnologias de diagnóstico. No entanto, a classificação de leucócitos desses vertebrados não é tarefa trivial (Rowley et al., 1988; Meseguer et al., 1994; Tavares-Dias & Moraes, 2004; Araújo et al., 2009). Além da descrição de aspectos morfológicos dos leucócitos após coloração de extensões sanguíneas com corantes clássicos tipo Romanowsky (corantes hematológicos de rotina), é crucial correlacionar essa morfologia com a funcionalidade dessas células. Aqui se usou como exemplo da complexidade deste tipo de tarefa, a redescrição de leucócitos do peixe pulmonado amazônico. Conclui-se que determinar os leucócitos presentes no sangue de vertebrados não-mamíferos é complexo, e pode render mais perguntas do que respostas.

Dos leucócitos observados, linfócitos, trombócitos e monócitos são os mais fáceis de classificar, baseado na morfologia após coloração com os corantes clássicos. No entanto, vale lembrar que linfócitos e monócitos são tipos celulares que quando observados por microscopia óptica em extensões coradas podem ser confundidos, principalmente quando se tenta diferenciar monócitos pequenos de linfócitos grandes. Neste sentido, um estudo básico usando a microscopia eletrônica de transmissão e a cultura de células é importante para ajudar na classificação dessas células. É fácil discriminar linfócitos de monócitos na análise ultra-estrutural. Essa caracterização deve ser realizada para determinar com precisão esses tipos celulares. O cultivo de leucócitos é outra metodologia que deve ser empregada para se caracterizar melhor os tipos celulares do sangue. Leucócitos podem ser separados de eritrócitos após centrifugação do sangue através de um colchão (Percoll, Histopaque, Ficoll Hypaque, Ficoll-paque) com densidade intermediária entre esse dois grupos de células (DaMatta et al., 2000; Silva et al., 2004; Alberio et al., 2005). Os leucócitos podem ser cultivados sobre lamínulas (ou diretamente na superfície da placa de cultura) e após alguns minutos as células aderentes são facilmente separadas das não aderentes (DaMatta et al., 1998a, 2000). De forma geral, monócitos e trombócitos são células com grande capacidade de adesão (DaMatta et al., 1998a). Com essa técnica foi possível determinar em galinhas que trombócitos não duram muito tempo em cultivo, já que sofrem morte celular por apoptose (DaMatta et al., 1999). Os

monócitos se diferenciam em macrófagos (DaMatta et al., 2000), o que facilita a caracterização desse tipo celular. O cultivo dessas duas células deve ser usado para a caracterização de suas funcionalidades. Uma funcionalidade celular que pode ser avaliada nestas células é a capacidade fagocítica. Demonstrou-se que em galinhas os trombócitos não são fagócitos profissionais (DaMatta et al., 1998b) e que macrófagos derivados de monócitos não produzem óxido nítrico quando estimulados com lipopolissacarídeo bacteriano (DaMatta et al., 2000).

Os granulócitos observados no sangue do peixe pulmonado foram denominados de tipo I, II e III. Quatro tipos de granulócitos (basófilos, dois eosinófilos e neutrófilo) foram descritos no peixe pulmonado australiano (Ward, 1969). No peixe pulmonado em estudo foi previamente demonstrado por Bielek & Strauss (1993) a presença de somente três tipos de granulócitos. No presente trabalho, confirmamos a presença dos três tipos de granulócitos. Observamos também, uma célula denominada de polimorfo agranulocítico com núcleo similar a neutrófilos humanos. No entanto, similar aos monócitos, essa célula não tinha grânulos abundantes e, portanto, não foi considerada um “granulócito”. Hine et al. (1990a, b), estudando o peixe pulmonado australiano descreveu um leucócito que denominou de neutrófilo. Não se pode descartar que o polimorfo agranulocítico descrito aqui seja similar ao neutrófilo descrito por esses autores (Hine et al., 1990a, b), pois tem a mesma morfologia nuclear. No entanto, esses autores descrevem essas células com grânulos, e às vezes reportam esse tipo celular sem grânulos (Hine et al., 1990b). Portanto, é possível que estejam confundindo esse tipo celular com um granulócito, mas que mesmo no peixe pulmonado australiano não tenha grânulos suficientes para que sejam classificados nesse grupo de células. Certamente mais estudos para caracterizar esse tipo celular são importantes.

O granulócito tipo III tem todas as características dos basófilos encontrados em vertebrados: número reduzido e grânulos basofílicos espalhados por toda a célula, inclusive por cima do núcleo. Portanto, esse tipo celular deve ser equivalente ao basófilo de mamíferos.

Tanto o granulócito tipo I como o II apresentaram grânulos eosinofílicos. O ensaio funcional de migração para tecido inflamado sugere fortemente que o tipo II é o granulócito inflamatório. Granulócitos inflamatórios com grânulos eosinofílicos foram descritos em lagarto (Alberio et al., 2005) e em peixes (Reite & Evensen, 2006). Desta forma, fica evidente que é esse tipo celular que corresponde ao neutrófilo humano. Pode-se partir do pressuposto que sempre haverá um tipo celular granulocítico que migra para tecidos inflamados.

O granulócito tipo I por exclusão pode ser considerado equivalente ao eosinófilo humano. No entanto, essa afirmativa é puramente especulativa. Como em mamíferos a funcionalidade de eosinófilos não é tão clara (Behm & Ovington, 2000; Klion & Nutman, 2004) fica complicado determinar com certeza qual tipo celular esse eosinófilo equivale nessa classe. Faz-se necessário desenvolver um ensaio funcional para melhor compreender esse tipo celular.

O leucócito denominado de polimorfo-agranulocítico é, sem duvida, o tipo celular mais intrigante do sangue do peixe pulmonado. Num primeiro momento, essa célula foi denominada de “neutrófilo” devido a seu

inconfundível núcleo polimorfonuclear. No entanto, essa célula não tem grânulos evidentes e, portanto, não pode ser considerada um granulócito. Como esta célula foi encontrada no tecido inflamado, está certamente envolvida na resposta imunológica celular. No entanto não deve ser essencial, pois está em pequeno número. Um fato intrigante é que esse tipo celular contém estruturas PAS-positivas. Essa marcação tem sido usada como um marcador de neutrófilos de peixes (Tavares-Dias & Moraes, 2004, 2006, 2007) ou de outro leucócito denominado de leucócito granular PAS-positivo (Tavares-Dias & Moraes, 2004). Considerando que: (1) esse tipo celular não tem grânulos; (2) subpopulações de monócitos (até macrófagos) foram descritas em peixes teleósteos (Pellizzon et al., 2002) e que este fato está estabelecido em algumas espécies de mamíferos (Gordon & Taylor, 2005), e (3) monócitos migram para tecido inflamado, faz sentido sugerir que esse tipo celular pode ser uma subpopulação de monócitos. Como o peixe pulmonado apresenta características do ancestral comum de teleósteo e vertebrado terrestre é possível que durante o processo evolutivo de teleósteo o granulócito tipo II tenha se tornado o granulócito inflamatório primordial nas várias espécies desse grupo. Seguindo essa linha de raciocínio, sugere-se que o polimorfo-agranulocítico pode ter possivelmente originado o neutrófilo de mamíferos durante o desenvolvimento dos vertebrados terrestres. Tem sido demonstrado que a programação de progenitores primários de leucócitos não é fixa em tipos celulares e pode ser redirecionada por reguladores transcricionais (Heyworth et al., 2002). Portanto, é possível que a célula descendente que originou o polimorfo-agranulocítico pode ter originado o neutrófilo após o aparecimento de muitos grânulos durante a evolução dos tetrápodes por um mecanismo genético similar. Isto pode ser um indicativo que esses peixes apresentam um tipo celular com núcleo polimorfo envolvido na resposta imunológica, mas que não adquiriu grânulos como os neutrófilos de mamíferos. Portanto, é possível que esse tipo celular seja um registro vivo de uma célula que pode ter originado os neutrófilos de vertebrados.

Outro fato intrigante reportado nesse trabalho se refere ao fato de que em 48 h de estímulo inflamatório na cavidade celômica desse peixe, não foi observado alteração na relação dos tipos celulares encontrados nos lavados. Em mamíferos é possível observar que com 48 horas a maior parte das células achadas no lavado peritoneal inflamado é composta de macrófagos originados de monócitos recém-migrados do sangue (Baron & Proctor, 1982). No caso do peixe pulmonado é possível que tempos mais longos sejam necessários para se observar alguma alteração na migração dos tipos celulares. Novos estudos usando outros estímulos e com tempos mais longos de análise são necessários para determinar essa possível alternância dos leucócitos que migram para a cavidade celômica inflamada.

Considerações finais

Fica evidente que a classificação/caracterização de leucócitos de peixes é tarefa complexa como já sugerido por outros autores (Ellis, 1977; Rowley et al., 1988; Meseguer et al., 1994). Portanto, o uso de ensaios funcionais é importante para complementar a caracterização morfológica de leucócitos de peixes na luz do que se conhece da biologia de leucócitos de vertebrados. Certamente o desenvolvimento de tecnologia de diagnóstico para peixes será

mais facilmente atingindo com o uso de ensaios funcionais em conjunto com caracterização morfológica.

Agradecimentos

Ao Francisco C. da Silva por manter os peixes em cativeiro. Ao Manoel C.M. de Souza e Antonio Julio de O. Monteiro pela ajuda na contenção do peixe. Ao Dr. José Antonio Picanço Diniz pelas inúmeras ajudas nas técnicas de separação dos leucócitos e de microscopia eletrônica de transmissão. Ao Dr. Ralph Lainson por ter permitido o uso do biotério de animais silvestres do Instituto Evandro Chagas. Ao Dr. Wanderley de Souza por ter sido e continuar a ser um grande incentivador e fomentador de pesquisas no Brasil, com especial atenção ao Pará. Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT-CNPq) 620214/2006-6, Fundação de Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD), Universidade Federal do Pará (UFPA) e Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).

Referências

ALBERIO, S. O.; DINIZ, J. A.; SILVA, E. O.; SOUZA, W. de; DAMATTA, R. A. 2005. Cytochemical and functional characterization of blood and inflammatory cells from the lizard *Ameiva ameiva*. *Tissue Cell.*, 37:193-202.

ARAÚJO, C. S. O.; TAVARES-DIAS, M.; GOMES, A. L. S.; ANDRADE, S. M. S.; LEMOS, J. R. G.; OLIVEIRA, A. T.; CRUZ, W. R.; AFFONSO, E. G. 2009. Infecções parasitárias e parâmetros sanguíneos em *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) cultivados no estado do Amazonas, Brasil. In: TAVARES-DIAS, M. (Org). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá, p. 389-424.

BARON, E. J.; PROCTOR, R. A. 1982. Elicitation of peritoneal polymorphonuclear neutrophils from mice. *J. Immunol. Methods*, 49:305-313.

BEHM, C. A.; OVINGTON, K. S. 2000. The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. *Parasitol. Today*, 16:202-209.

BIELEK, E. 1981. Developmental stages and localization of peroxidatic activity in the leucocytes of three teleost species (*Cyprinus carpio* L.; *Tinca tinca* L.; *Salmo gairdneri* Richardson). *Cell Tissue Res.*, 220:163-180.

BIELEK, E.; STRAUSS, B. 1993. Ultrastructure of the granulocytes of the South-American lungfish, *Lepidosiren paradoxa* - morphogenesis and comparison to other leukocytes. *J. Morphol.*, 218:29-41.

DAMATTA, R. A.; MANHÃES, L.; LASSOUNSKAIA, E.; SOUZA, W. de. 1999. Chicken thrombocytes in culture: lymphocyte-conditioned medium delays apoptosis. *Tissue Cell*, 31:255-263.

DAMATTA, R. A.; MANHÃES, L.; SEABRA, S. H.; SOUZA, W. de. 1998a. Coculture of chicken thrombocytes and monocytes: morphological changes and lectin binding. *Biocell*, 22:45-52.

DAMATTA, R. A.; SEABRA, S. H.; SOUZA, W. de. 1998b. Further studies on the phagocytic capacity of chicken thrombocytes. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol*., 30:271-277.

DAMATTA, R. A.; SEABRA, S. H.; MANHÃES, L.; SOUZA, W. de. 2000. Nitric oxide is not involved in the killing of *Trypanosoma cruzi* by chicken macrophages. *Parasitol. Res*., 86:239-243.

ELLIS, A. E. 1977. The leucocytes of fish: a review. *J. Fish Biol*., 11:453-491.

FINN, R. N.; KRISTOFFERSEN, B. A. 2007. Vertebrate vitellogenin gene duplication in relation to the "3R hypothesis": correlation to the pelagic egg and the oceanic radiation of teleosts. *PLoS ONE,* 2:e169.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K.; PACHALY, J. R. 2005. *Manual de Hematologia Veterinária*. 2 ed. São Paulo: Editora Varela.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol*., 5:953-964.

HAJDU, S. I. 2003. A note from history: The discovery of blood cells. *Ann. Clin. Lab. Sci*., 33:237-238.

HARRIS, H. 2000. *The Birth of the Cell*. 1. ed. Yale: Yale University Press.

HEYWORTH, C.; PEARSON, S.; MAY, G.; ENVER, T. 2002. Transcription factor-mediated lineage switching reveals plasticity in primary committed progenitor cells. *EMBO J*., 21:3770-3781.

HINE, P. M.; LESTER, R. J. G.; WAIN, J. M. 1990a. Observations on the blood of the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri* Klefft .1. Ultrastructure of granulocytes, monocytes and thrombocytes. *Aust. J. Zool*., 38:131-144.

HINE, P. M.; WAIN, J. M.; LESTER, R. J. G. 1990b. Observations on the blood of the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri* Klefft.2. Enzyme cytochemistry of blood cells, peritoneal-macrophages and melanomacrophages. *Aust. J. Zool*., 38:145-154.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. 2004. *Histologia Básica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

KLION, A. D.; NUTMAN, T. B. 2004. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *J. Allergy Clin. Immunol*., 113:30-37.

MESEGUER, J.; LOPEZ-RUIZ, A.; ANGELES ESTEBAN, M. 1994. Cytochemical characterization of leucocytes from the seawater teleost, gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Histochemistry*, 102:37-44.

MITCHELL, D. 2009. Blood Staining: A Brief History. In: *Health Field* (http://healthfieldmedicare.suite101.com/article.cfm/blood_staining_a_brief_history#ixzz0Br3yhvJP).

PELLIZZON, C. H.; NAKAGHI, L. S.; AZEVEDO, A.; CASALETTI, L.; LUNARDI, L. O. 2002. Localization of peroxidase activity in blood mononuclear phagocytes in pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol*., 34:377-379.

PIMPÃO, C. T.; ZAMPRONIO, A. R.; SILVA DE ASSIS, H. C. 2008. Exposure of *Ancistrus multispinis* (Regan, 1912, Pisces, Teleostei) to deltamethrin: effects on cellular immunity. *Fish Shellfish Immunol*., 25:528-532.

PINHEIRO DA SILVA, F.; SORIANO, F. G. 2009. Neutrophils recruitment during sepsis: critical points and crossroads. *Front. Biosci.*, 14:4464-4476.

REITE, O. B.; EVENSEN, O. 2006. Infammatory cells of teleostean fish: A review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish Shellfish Immunol.*, 20:192-208.

RIBEIRO, M. L.; DAMATTA, R. A.; DINIZ, J. A.; SOUZA, W. de; NASCIMENTO, J. L. do; CARVALHO, T. M. de. 2007. Blood and inflammatory cells of the lungfish *Lepidosiren paradoxa*. *Fish Shellfish Immunol*., 23:178-187.

ROWLEY, A. F.; HUNT, T. C.; PAGE, M.; MAINWARING, G. 1988. Fish. In: ROWLEY, A. F.; RATCLIFFE, N. A. (Ed.). *Vertebrate blood cells*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 19-127.

SILVA, E. O.; DINIZ, J. P.; ALBERIO, S.; LAINSON, R.; SOUZA, W. de; DAMATTA, R. A. 2004. Blood monocyte alteration caused by a hematozoan infection in the lizard *Ameiva ameiva* (Reptilia: Teiidae). *Parasitol. Res*., 93:448-456.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. de. 2004. *Hematologia de Peixes Teleósteos*. 1.ed. Ribeirão Preto: Villimpress

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2007. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. *Vet. Clin. Pathol*., 36:49-54.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2006. Morphological, cytochemical, and ultrastructural study of thrombocytes and leukocytes in neotropical fish, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Characidae, Bryconinae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol*., 38:209-215.

VENITA, J. 2009. A portrait of history: Paul Ehrlich. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. FindArticles.com.

WARD, J. W. 1969. Hematological studies on Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *Copeia*, 3: 633-635.

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 13

Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica

Fabiana Satake, Santiago Benites de Pádua & Márcia Mayumi Ishikawa

Resumo
Os distúrbios morfológicos em eritrócitos, leucócitos e trombócitos sanguíneos podem ser utilizados como ferramenta para avaliação prognóstica dos peixes frente aos desafios do ambiente de cultivo, visto que estas alterações ocorrem em resposta aos danos causados por agentes agressores. Estes distúrbios em eritrócitos, frequentemente, estão associados a enfermidades que provocam anemia, sendo comum a observação de divisões mitóticas, policromasia e anisocitose eritrocitária. Podem ser encontrados também nas extensões sanguíneas os eritroplastídeos, divisão amitótica, micronúcleos e vacuolização citoplasmática, contudo, estas alterações geralmente estão relacionadas à exposição a agentes tóxicos. Em leucócitos, esses distúrbios são mais acentuados em processos infecciosos, sendo que as alterações tóxicas em neutrófilos e LG-PAS são mais pronunciadas, ocorrendo basofilia citoplasmática, corpúsculo de Döhle, granulação tóxica, vacuolização citoplasmática, anisocitose, neutrófilos gigantes e com projeções citoplasmáticas, divisão mitótica e células binucleadas. Já em monócitos e trombócitos a vacuolização citoplasmática é a alteração mais comum, mas esse distúrbio pode ser verificado também em basófilos e linfócitos.

Abstract
The morphological disorders in blood erythrocytes, leukocytes and thrombocytes can be used as a tool for prognostic assessment of the challenges that the fish are exposed in culture, because these changes can occur to injury caused by agents aggressors. These disorders in red

blood cells are often associated with diseases that cause anemia, causing mitotic divisions, polychromasia and erythrocyte anisocytosis. Can also be found erythroplastides, amitotic division, micronuclei and cytoplasmic vacuolation, however, these changes are usually related to exposure to toxic agents. The disorders in leukocytes are generally more pronounced in infectious diseases, and the toxic changes in neutrophils and PAS-GL are more pronounced, occurring cytoplasmic-basophilia, Döhle corpuscle, toxic granulation, cytoplasmic-vacuolization, anisocytosis, giant neutrophils, cytoplasmic projection, mitotic division and cells with two nuclei. For monocytes and thrombocytes, the cytoplasmic vacuolation is the change usually found, but this disorder can be also found in basophils and lymphocytes.

Introdução

Muitas doenças que acometem os peixes causam anormalidades no sangue e em seus constituintes, sendo estes distúrbios caracterizados por alterações na estrutura, função ou nos mecanismos de coagulação (Clauss et al., 2008). Estas alterações ocorrem em condições clínicas nas quais há distúrbios da homeostase orgânica, sendo determinadas por diferentes tipos de agentes infecciosos, parasitários, químicos, físicos, além de distúrbios metabólicos e nutricionais (Tavares-Dias & Moraes, 2004).

Os distúrbios hematológicos que surgem com a evolução dos processos patológicos são imprescindíveis para o estudo da patogenia das enfermidades que acometem os peixes, visto que já são amplamente explorados na hematologia clínica de mamíferos domésticos. As alterações identificadas na estrutura das células sanguíneas podem ser utilizadas como ferramenta para avaliação prognóstica em peixes mórbidos, já que a ocorrência de determinados distúrbios indicam a resposta do organismo à injúria. Assim, pode-se inferir sobre a evolução de um processo patológico a partir da avaliação qualitativa das células sanguíneas.

Algumas alterações morfológicas foram descritas em eritrócitos de peixes parasitados naturalmente por *Goezia leporini* (Martins et al., 2004) e em leucócitos devido à bacteriose (Ranzani-Paiva et al., 2004) e infecções mistas por *Anacanthorus penilabiatus* e *Piscinoodinium pillulare* (Tavares-Dias et al., 2008). No entanto, estas alterações não têm sido frequentemente descritas nos estudos sobre patogenia das enfermidades que acometem os peixes, especialmente no que se refere aos leucócitos.

Distúrbios morfológicos em eritrócitos

Os eritrócitos são as células mais abundantes na circulação, sendo sua principal função o transporte de oxigênio e gás carbônico (Ranzani-Paiva, 2007). As alterações em sua estrutura estão frequentemente relacionadas à resposta do organismo frente aos processos anemiantes.

Uma característica fisiológica dos peixes, é que a maturação de eritrócitos e leucócitos ocorre normalmente na corrente circulatória, esta particularidade torna a interpretação do hemograma destas espécies diferenciada. No entanto, em peixes anêmicos pode-se verificar aumento das formas imaturas de eritrócitos na circulação. Nestes casos, tanto

policromasia, quanto anisocitose são observadas em intensidade moderada a acentuada. Na anemia severa podem ser observados estágios anteriores de maturação, como eritroblastos basofílicos e eritroblastos policromatofílicos, nestas células ocorrem divisões mitóticas, e, em mamíferos se inicia a produção de hemoglobina (Car, 2000).

Espécimes de híbridos de pintados (*Pseudoplatystoma fasciatum* x *P. curruscans*), oriundos do cultivo intensivo do estado de Mato Grosso do Sul, apresentando septicemia hemorrágica bacteriana por *Pseudomonas* sp, foram examinados e procedeu-se coleta de sangue para realização do hemograma. Durante a avaliação da morfologia dos eritrócitos foram observados eritroblastos basofílicos e grande número de eritrócitos em divisão mitótica (Figura 2A–F), assim como moderada anisocitose eritrocitária e policromasia em resposta à anemia instalada (hematócrito de 10,0 ± 4,2%). Este conjunto de alterações caracteriza um quadro de anemia regenerativa descrito também em *L. macrocephalus* infectados naturalmente pelo nematóide *G. leporini* (Martins et al., 2004).

Na contagem diferencial de leucócitos, alguns eritroblastos basofílicos podem ser confundidos com leucócitos imaturos devido a sua grande semelhança, especialmente em híbridos de pintados. No entanto, três características podem auxiliar na diferenciação de eritroblastos basofílicos dos leucócitos imaturos:

1) **Aspecto da cromatina nuclear***:* nos eritroblastos basofílicos a cromatina apresenta-se mais grosseiramente rugosa se comparada aos leucócitos imaturos;
2) **Disposição do núcleo***:* nos eritroblastos basofílicos o núcleo apresenta-se, geralmente, no centro da célula; enquanto que nos leucócitos imaturos o núcleo localiza-se preferencialmente na periferia da célula, com deslocamento oposto do citoplasma;
3) **Formato da célula***:* os eritroblastos basofílicos geralmente possuem formato regular elíptico, sendo que o núcleo acompanha o formato celular; nos leucócitos imaturos o formato do núcleo pode ser irregular, redondo ou reniforme.

A presença de eritrócitos com ruptura citoplasmática (células fantasmas) nas extensões sanguíneas pode ocasionar confusões, sendo erroneamente denominadas eritroblastos, devido à tumefação da cromatina nuclear, aparentando-se como uma célula blástica (Figura 1G). Essas alterações são artefatos de técnicas que ocorrem no momento da confecção das extensões sanguíneas, podendo ser ocasionadas pelo anticoagulante EDTA-10%, que provoca hemólise em algumas espécies de peixes, ou pela administração de anestésicos que aumentam a fragilidade da membrana dos eritrócitos.

A ocorrência de divisão amitótica em eritrócitos de peixes parece ser comumente encontrada em pequenas proporções em peixes saudáveis (Figura 3), assim como em outros animais vertebrados como os anfíbios (Barni et al., 2007), répteis e aves (Franco, 1943). Compreende uma modalidade de divisão celular direta, sem a segregação de cromossomos, podendo haver eritrócitos com núcleo apresentando constrição, fendidos com citoplasma normal ou com citoplasma em constrição, assim como eritrócitos binucleados com constrição citoplasmática e eritrócito com constrição

citoplasmática e com núcleo normal (Franco, 1943). Este último mecanismo é descrito por alguns autores como responsável pela formação de eritroplastídeos em anfíbios (Barni et al., 2007) e peixes teleósteos (Fijan, 2002). Os eritroplastídeos podem ser observados em peixes que não manifestam sinais clínicos ou laboratoriais de doença em uma porcentagem de 0,01 (Fijan, 2002) a 0,2% (Murad et al., 1993) dos eritrócitos, ou mesmo estar ausente em algumas espécies (Tavares-Dias & Barcellos, 2005). No entanto, o aumento da frequência de observação destas estruturas pode estar relacionado à poluição ambiental (Barni et al., 2007) ou associado à resposta frente ao parasitismo (Martins et al., 2004).

Barni et al. (2007) descreveram dois mecanismos de formação dos eritroplastídeos em rãs *Rana esculenta*, sendo um deles homólogo à formação das hemácias de mamíferos, com condensação da cromatina nuclear, periferização nuclear e seguinte denucleação (expulsão do núcleo) e outra forma ocorrendo por simples segmentação citoplasmática, formando um eritrócito pequeno com núcleo picnótico e um eritroplastídeo, também menor, quando comparado ao primeiro mecanismo de formação. De forma similar, nos peixes podem ser verificados os dois mecanismos de formação dos eritroplastídeos (Figura 4), havendo peculiaridades de acordo com a espécie. Por exemplo, em tuviras *Gymnotus* sp. há uma predominância de eritroplastídeos grandes (Figura 4E), possivelmente por maior frequência de denucleação dos eritrócitos em relação à simples segmentação citoplasmática, porém ambas as modalidades são verificadas nesta espécie. Por outro lado, em *Piaractus mesopotamicus* os eritroplastídeos pequenos são vistos com maior frequência nas extensões sanguíneas (Figura 4K). Alguns autores citam que a divisão amitótica e ocorrência de eritroplastídeos podem estar relacionadas a processos patológicos que acarretariam prejuízo em sua remoção pelo baço (Ellis, 1984), à otimização do transporte de oxigênio (Murad et al., 1993) e ao processo fisiológico de senescência destas células (Fijan, 2002; Tavares-Dias & Barcellos, 2005).

Micronúcleos (Figura 3D e G) são fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo principal durante a divisão celular, apresentam-se como inclusões citoplasmáticas normalmente perinucleares (Grisolia & Starling, 2001; Mouchet et al., 2006; Barni et al., 2007). Sua origem pode ser determinada por distúrbios clastogênicos, por meio da fragmentação do DNA, ou aneugênicos, a partir de distúrbios no aparelho mitótico (Arkhipchuk & Garanko, 2005; Barni et al., 2007). A análise do micronúcleo associada à quantificação de divisões amitóticas e eritroplastídeos tem sido utilizada na avaliação das influências antrópicas sobre os ecossistemas aquáticos, utilizando os peixes, anfíbios e répteis como bioindicadores (Grisolia & Starling, 2001).
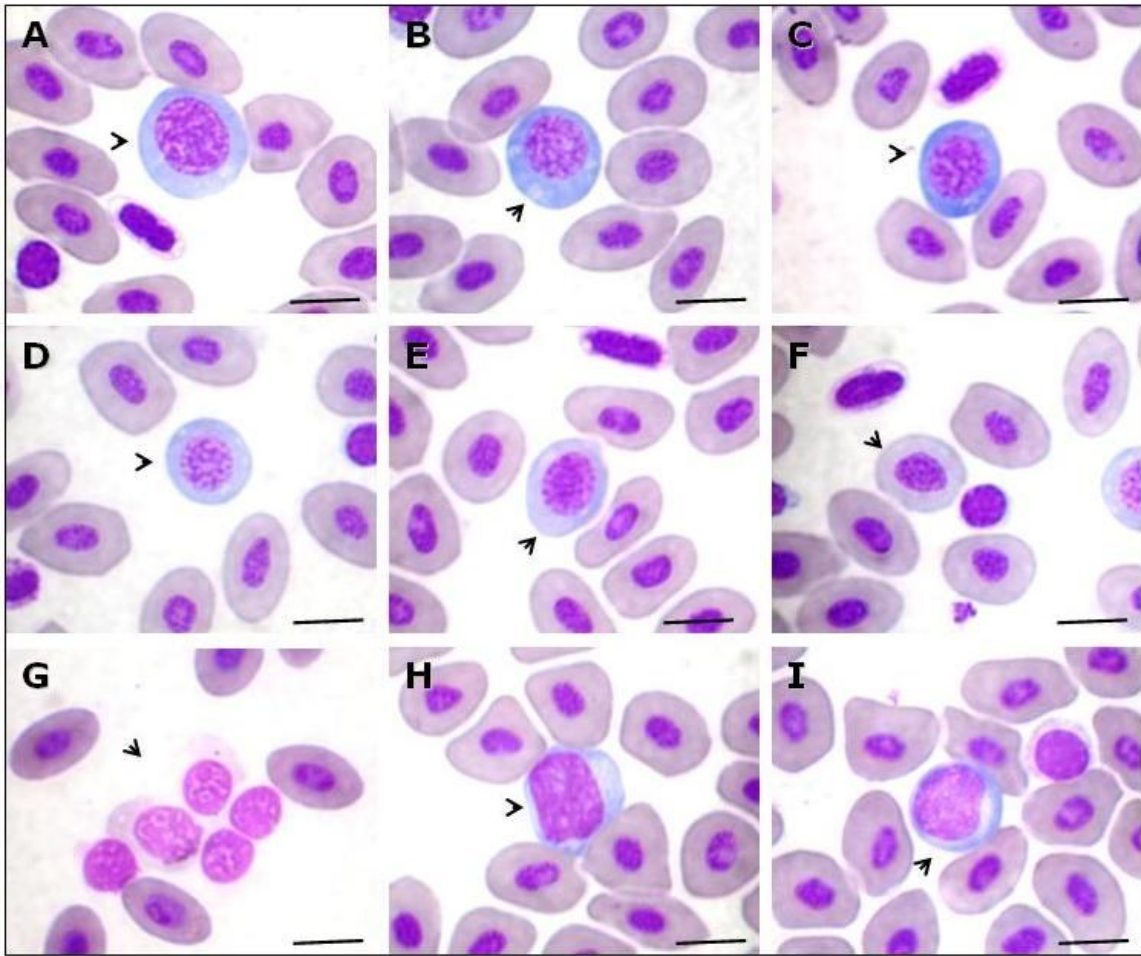
Figura 1. **(A–C)** Eritroblastos basofílicos e **(D–F)** eritroblastos policromatofílicos no sangue periférico de *Pseudoplatystoma* sp. (**G)** Eritrócitos lisados (Células Fantasmas) no sangue de kinguio (*Carassius auratus auratus*). **(H-I)** Leucócitos imaturos no sangue periférico de *Pseudoplatystoma* sp. Coloração May Grünwald-Giemsa-Wright. Barra = 5 µm.
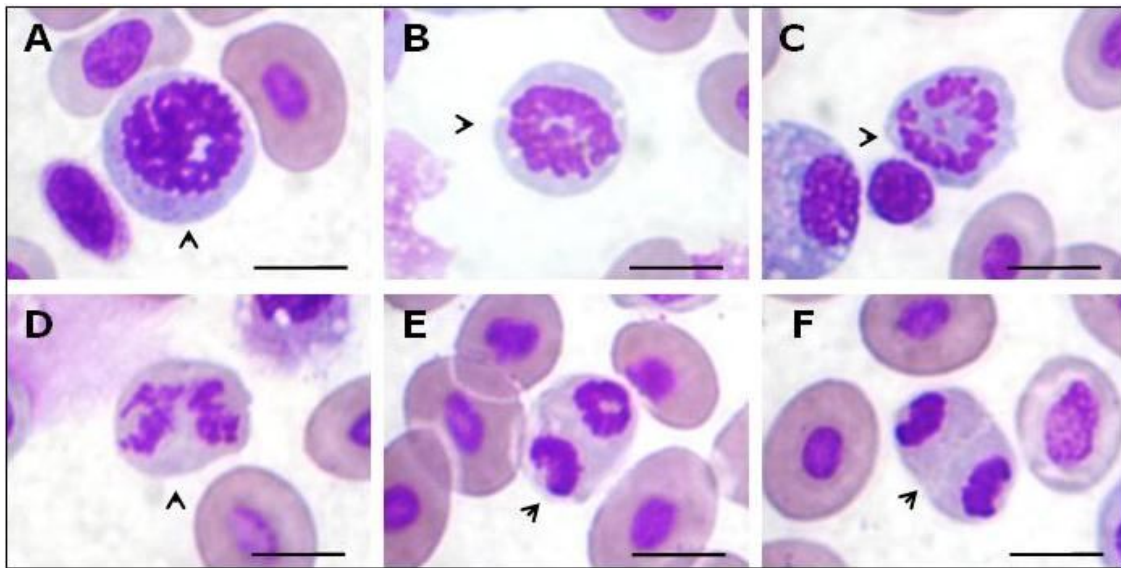
Figura 2. **(A-F)** Eritrócitos do sangue periférico de híbridos de pintado em diferentes fases de divisão mitótica. Coloração May Grünwald-Giemsa-Wright. Barra = 5 μm.
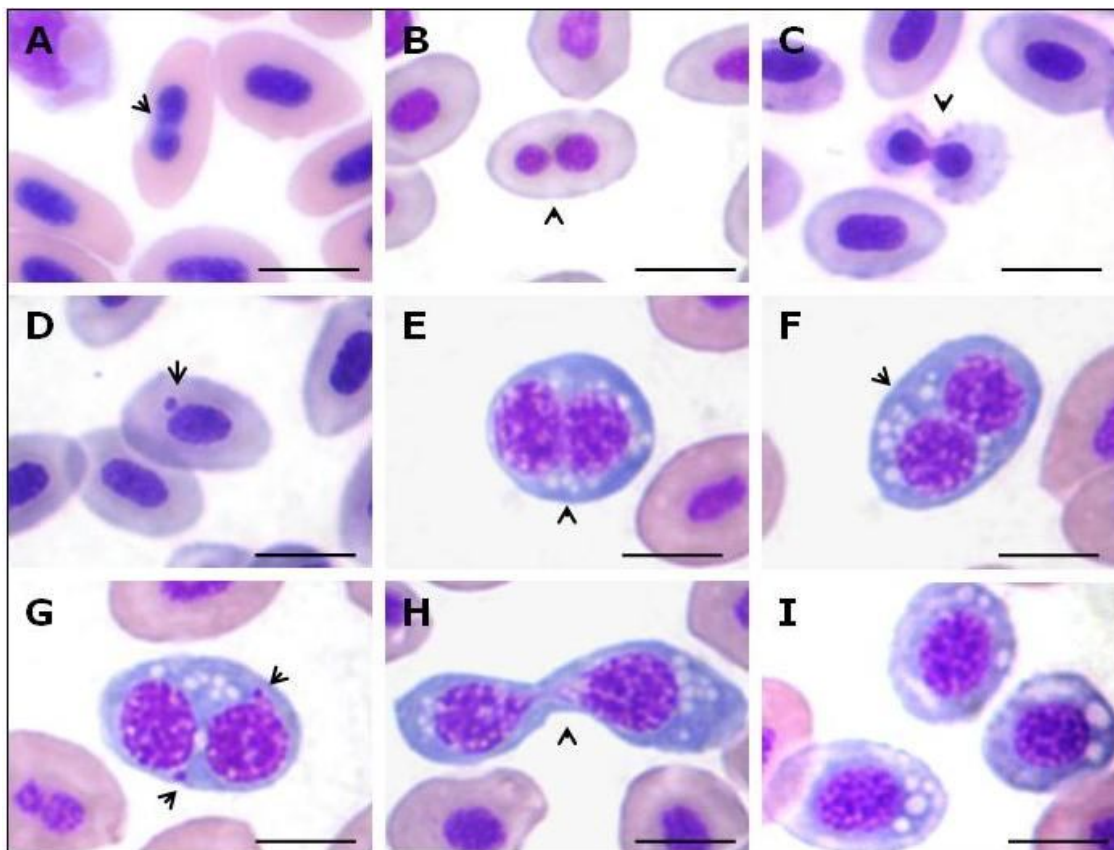
Figura 3. Divisão amitótica, micronúcleos e vacuolização citoplasmática em eritrócitos do sangue periférico em peixes de cultivo. **(A)** Constrição nuclear em eritrócito de *Salminus brasiliensis*. **(B)** Constrição nuclear em eritrócito de *Pseudoplatystoma* sp. **(C)** Constrição citoplasmática e nuclear em eritrócito de *Colossoma macropomum*. **(D)** Micronúcleo em *C. macropomum*. **(E–F)** Constrição nuclear em eritrócitos jovens de *P. mesopotamicus*. **(G)** Eritrócito jovem binucleado com micronúcleos em *P. mesopotamicus* (setas). **(H)** Eritrócito jovem com constrição de núcleo e citoplasma. **(I)** Policromasia e vacuolização citoplasmática em *P. mesopotamicus*. Coloração May Grünwald-Giemsa-Wright. Barra = 5 µm.
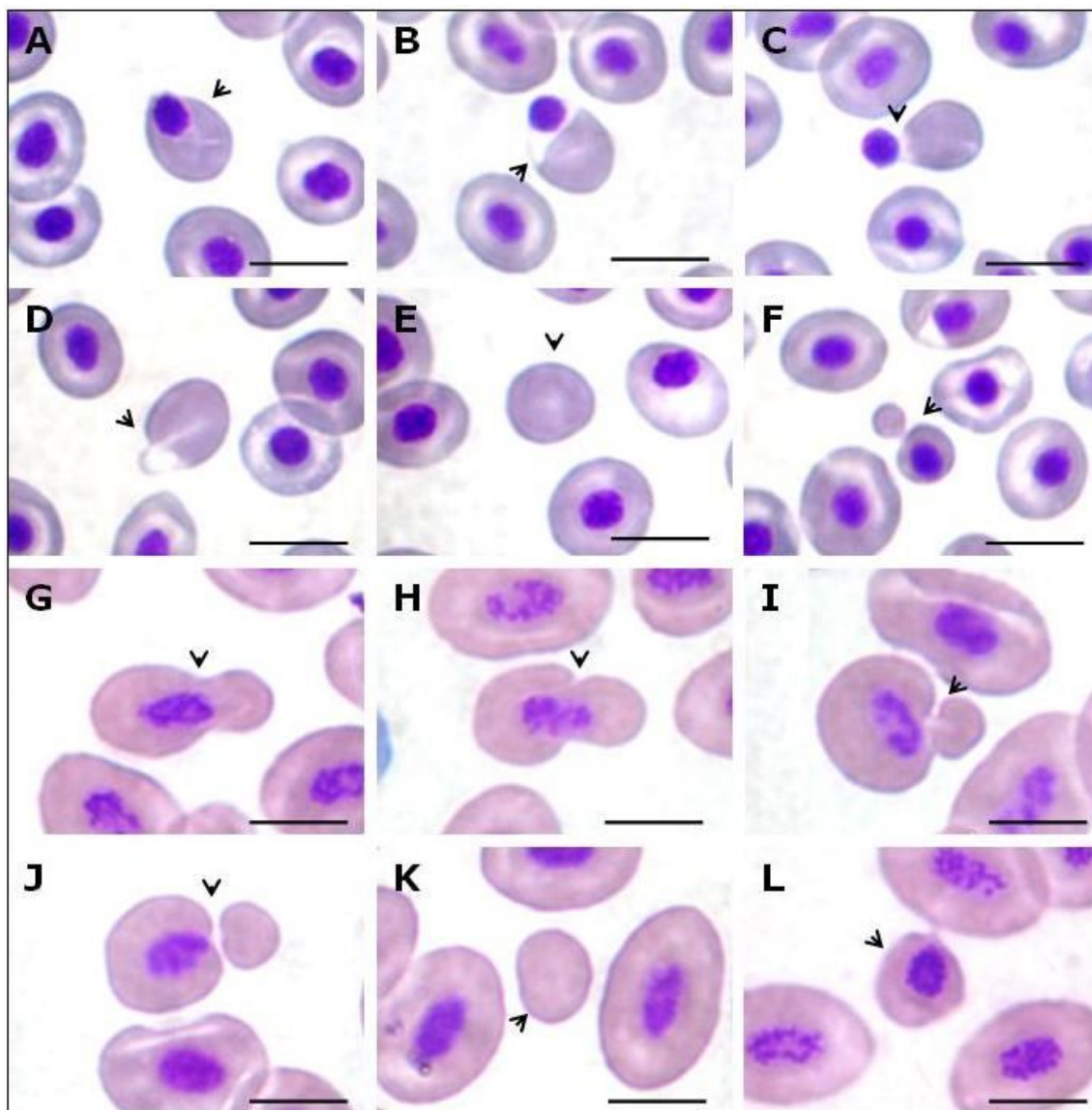
Figura 4. Formação de eritroplastídeos em peixes de cultivo. **(A–D)** Periferização nuclear seguida de denucleação em eritrócitos de *Gymnotus* sp. **(E)** Eritroplastídeo de *Gymnotus* sp. **(F)** Segmentação citoplasmática de eritrócito em *Gymnotus* sp. **(G–J)** Segmentação citoplasmática em eritrócitos de *P. mesopotamicus*. **(K)** Eritroplastídeo de *P. mesopotamicus*. **(L)** Eritrócito senil de *P. mesopotamicus*. Coloração May Grünwald-Giemsa-Wright. Barra = 5 µm.

Distúrbios morfológicos em leucócitos e trombócitos

Os leucócitos são as células responsáveis pela defesa humoral e celular do organismo dos peixes (Tavares-Dias & Moraes, 2007), os quais utilizam a via sanguínea para realizar o monitoramento de possíveis infecções e danos teciduais. São compostos por diferentes linhagens celulares, as quais podem ser diferenciadas morfologicamente pela presença ou ausência de granulação, assim como pelas suas características morfológicas, tintoriais e citoquímicas.

Os trombócitos de peixes também possuem fundamental importância na defesa orgânica. Além de promover a hemostasia, estas células podem desempenhar função fagocítica (Burrows et al., 2001; Stosik et al., 2001; Tavares-Dias et al., 2007), além da sua habilidade de migrar para o foco inflamatório (Martins et al., 2008).

Em peixes teleósteos é comum a ocorrência de leucócitos em diferentes fases de maturação no sangue periférico (Ranzani-Paiva, 1995). Esta característica dificulta a diferenciação destas células durante a contagem relativa, bem como na identificação das alterações morfológicas em peixes mórbidos. Entre as características utilizadas pelo patologista clínico para avaliar o estágio de maturação dos leucócitos estão o tamanho da célula, o aspecto da cromatina nuclear, a característica dos grânulos e a coloração citoplasmática. De acordo com estes parâmetros propõem-se uma sequência de maturação para monócitos, eosinófilos e basófilos de *Pseudoplatystoma* sp. (Figura 5). Neste esquema, tanto eosinófilos quanto basófilos jovens apresentariam granulação em forma de bastão, variada quantidade de grânulos e cromatina nuclear frouxa.

As alterações morfológicas em leucócitos auxiliam na determinação da etiopatogenia das enfermidades e na interpretação do leucograma em mamíferos (Smith, 2000). No entanto, alguns parâmetros adotados em mamíferos não são adequados quando empregados em peixes. Um exemplo disto é a contagem diferencial de neutrófilos imaturos (mielócitos, metamielócitos e neutrófilos bastonetes), que não apresenta valor prognóstico em peixes. Pois como já citado, a observação de células jovens na corrente circulatória de peixes, quando em baixa intensidade, não está relacionada a alterações patológicas. Além do mais, há, normalmente, grande número de neutrófilos com núcleo oval no sangue circulante, não sendo encontradas com frequência, as formas com núcleo segmentado. Para que os distúrbios morfológicos em leucócitos de peixes sejam utilizados como uma ferramenta prognóstica, deve-se então, considerar a intensidade de ocorrência destas alterações em peixes doentes.

Entre as alterações morfológicas observadas nas extensões sanguíneas de híbridos de pintado que apresentavam septicemia hemorrágica por *Pseudomonas* sp., pode-se constatar neutrófilos com basofilia e vacuolização citoplasmática, presença de corpúsculo de Döhle, projeções citoplasmática, anisocitose neutrofílica, neutrófilos em divisão mitótica; neutrófilos binucleados e neutrófilos atípicos gigantes; já em leucócitos granulares PAS-positivos a granulação tóxica foi mais frequente (Figura 6).

A ocorrência de alterações tóxicas em neutrófilos pode estar relacionada à liberação de neutrófilos imaturos para a circulação (Ranzani-Paiva et al., 2004), isso ocorre quando estas células são produzidas de forma acelerada pelos órgãos leucopoiéticos atuando como parte da resposta

inflamatória à infecção instalada (Liongue et al., 2009). Segundo Smith (2000), as alterações tóxicas visualizadas em neutrófilos são em sua maioria observadas no citoplasma. Entre estas alterações estão incluídas a basofilia e vacuolização citoplasmáticas, granulação tóxica, presença de corpúsculos de Döhle e neutrófilos gigantes.

A vacuolização citoplasmática geralmente ocorre em células que possuem habilidade fagocítica. Segundo Bienzle (2000) monócitos de mamíferos altamente vacuolizados podem estar associados ao aumento da atividade fagocítica em algumas doenças. No entanto, alguns autores correlacionam esta alteração à liberação de toxinas bacterianas (Guimarães et al., 2002; Shao et al., 2004). A vacuolização citoplasmática é mais frequente em monócitos, determinando a ocorrência de monócitos ativados e hiperativados (Figura 7B-D). Porém, este distúrbio pode também ser identificado em neutrófilos (Figura 6G), basófilos (Figura 7H), trombócitos (Figura 7K-M) e linfócitos (Figura 7N).

A ocorrência de neutrófilos em divisão mitótica no sangue circulante não tem sido descrita na literatura, sendo incerto o mecanismo que determina sua divisão. Este mecanismo excepcional pode estar relacionado a um maior suprimento de fagócitos para o foco inflamatório. No entanto, essa alteração não é observada com frequência. Neste sentido, este mecanismo pode estar envolvido com a senescência desta célula. O mecanismo que determina a ocorrência de neutrófilos binucleados (Figura 6J) também é incerto. Contudo, deve-se diferenciá-lo de neutrófilo com segmentação nuclear (Figura 6B).

A constatação de anisocitose neutrofílica normalmente está relacionada à neutrofilia e ocorrência de neutrófilos em diferentes estágios de maturação. Consideramos patológica sua observação somente quando se apresentam com intensidade moderada a intensa. Em processos infecciosos podem ser identificadas células com intensa basofilia citoplasmática e granulação robusta (Figura 6D), características morfológicas compatíveis com progranulócitos. Essa alteração pode indicar desvio de neutrófilos à esquerda em peixes teleósteos, já que não é comum encontrar este estágio de maturação no sangue circulante de peixes saudáveis.

Associada aos casos de toxicidade crônica em mamíferos está a observação de neutrófilos gigantes (Smith, 2000). Esta alteração pode estar relacionada a desarranjos da estrutura citoesquelética que determinam a ocorrência de células com citoplasma irregular (Figura 6K) e aparentemente maiores (Figura 6L).

Os monócitos são precursores sanguíneos dos macrófagos teciduais (Afonso et al., 1998). Estas células sofrem alterações estruturais após a diapedese. No entanto, em condições patológicas estas alterações estruturais podem ocorrer em monócitos sanguíneos, nestes casos observa-se intensa vacuolização citoplasmática, presença de pseudópodes (Figura 7B-D) e até mesmo atividade fagocítica na corrente circulatória (Figura 7E-F).

A observação de vacuolização citoplasmática (Figura 7H) e a presença de inclusão citoplasmática compatível com eritroplastídeo (Figura 7I) em basófilos podem sugerir uma possível habilidade fagocítica deste leucócito, já que basófilos de mamíferos podem desempenhar tal função (Jain, 1993).

Entre as alterações morfológicas comumente observadas em linfócitos de mamíferos estão a presença de linfócitos reacionais ou imunócitos,

presença de zona perinuclear e poucos vacúolos no citoplasma (Schultze, 2000), tais alterações também ocorrem em linfócitos de peixes com suspeita de septicemia hemorrágica bacteriana (Figura 7O). Além disto, segundo Li et al. (2006) os linfócitos B de peixes teleósteos apresentam atividade fagocítica e microbicida, e esta seria uma evidência de que esta célula teria sua origem em células fagocíticas responsáveis pela imunidade inata.
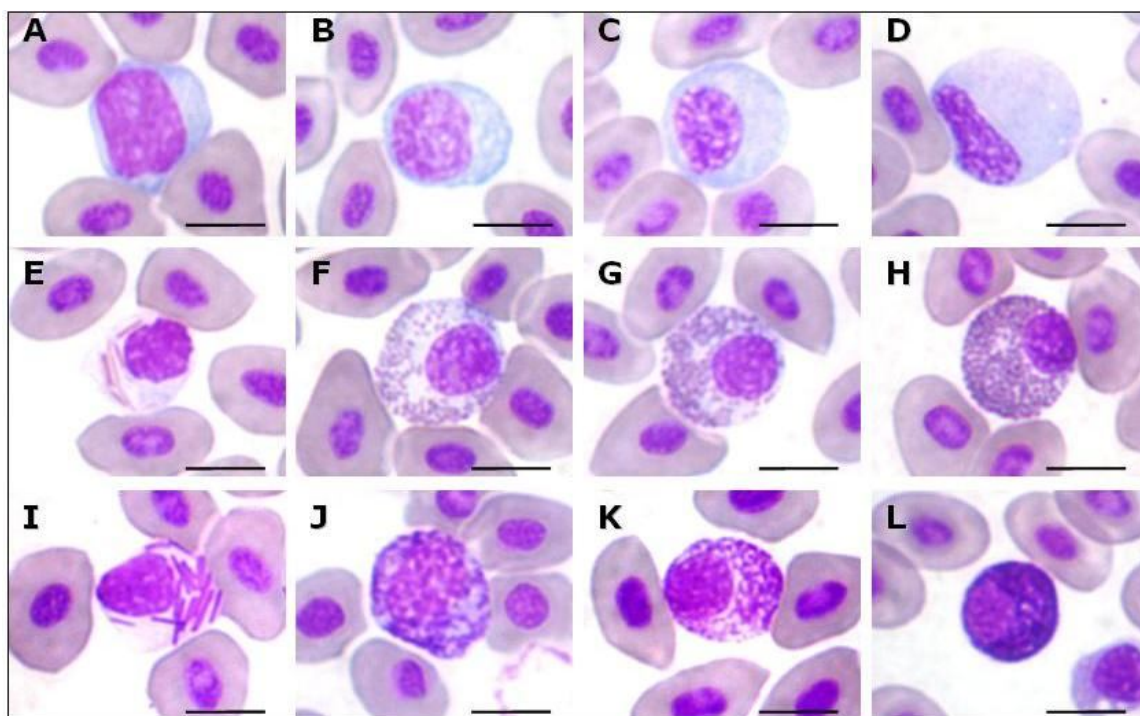
Figura 5. Leucócitos em diferentes estágios de maturação no sangue de *Pseudoplatystoma* sp. **(A)** Leucócito imaturo. **(B-D)** Monócitos. **(E-H)** Eosinófilos. **(I-L)** Basófilos. Coloração May Grünwald-Giemsa-Wright. Barra = 5 µm.
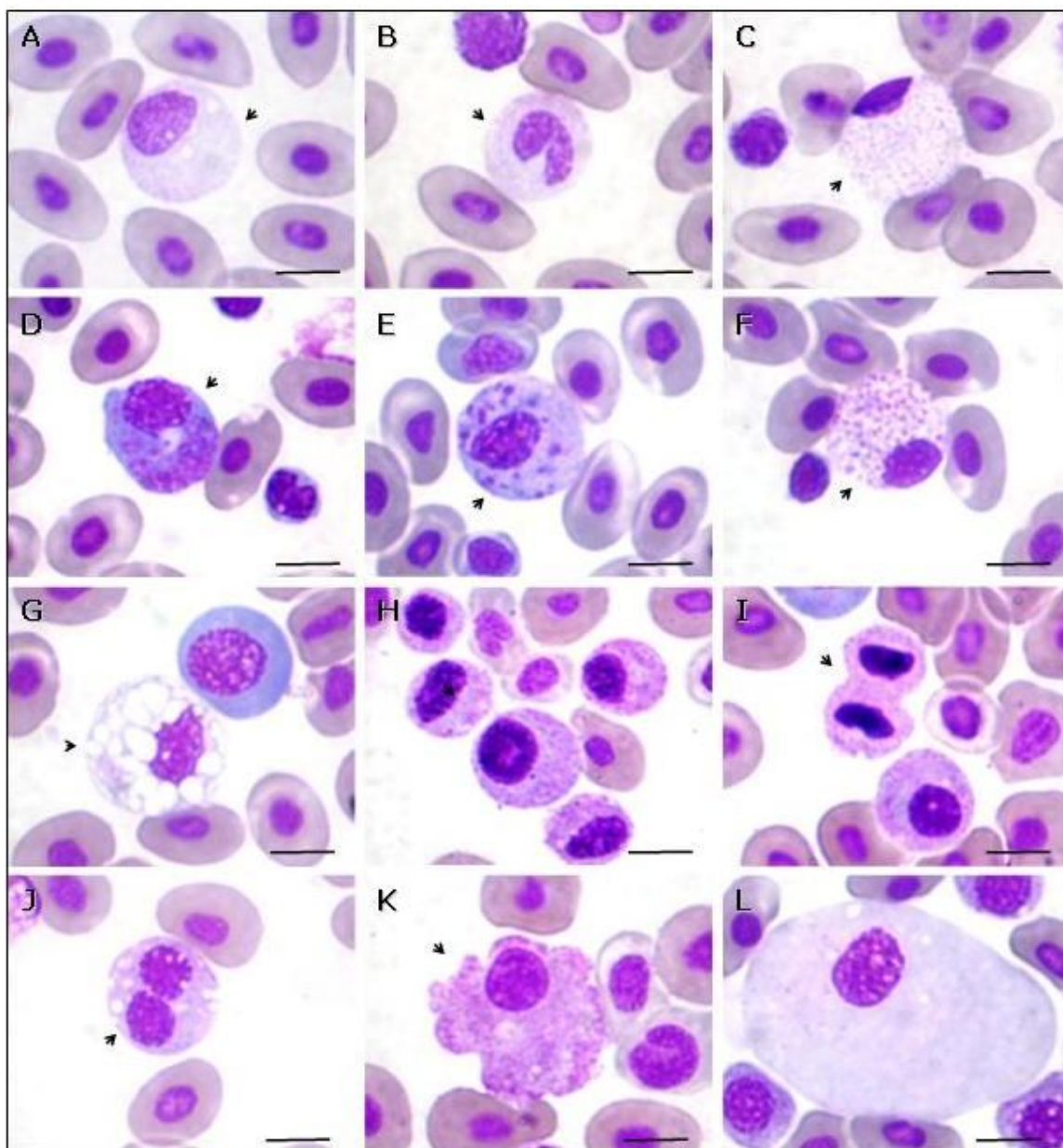
Figura 6. **(A-L)** Alterações morfológicas em neutrófilos e em leucócitos granular PAS-positivos (LG-PAS) de híbridos de pintados com septicemia hemorrágica bacteriana por *Pseudomonas* sp. **(A)** Neutrófilo normal com núcleo oval e discreta vacuolização citoplasmática. **(B)** Neutrófilo normal com núcleo segmentado. **(C)** LG-PAS com características normalmente observadas em híbridos de pintados hígidos. **(D)** Pró-granulócito. **(E)** Neutrófilo com basofilia citoplasmática e corpúsculos de Döhle. **(F)** LG-PAS com granulação tóxica. **(G)** Neutrófilo com intensa vacuolização citoplasmática. **(H)** Neutrófilos com intensa anisocitose. **(I)** Neutrófilo em divisão mitótica. **(J)** Neutrófilo binucleado e com moderada vacuolização citoplasmática. **(K)** Neutrófilo com projeções citoplasmáticas. **(L)** Neutrófilo gigante. Coloração May Grünwald-Giemsa-Wright. Barra = 5 μm.
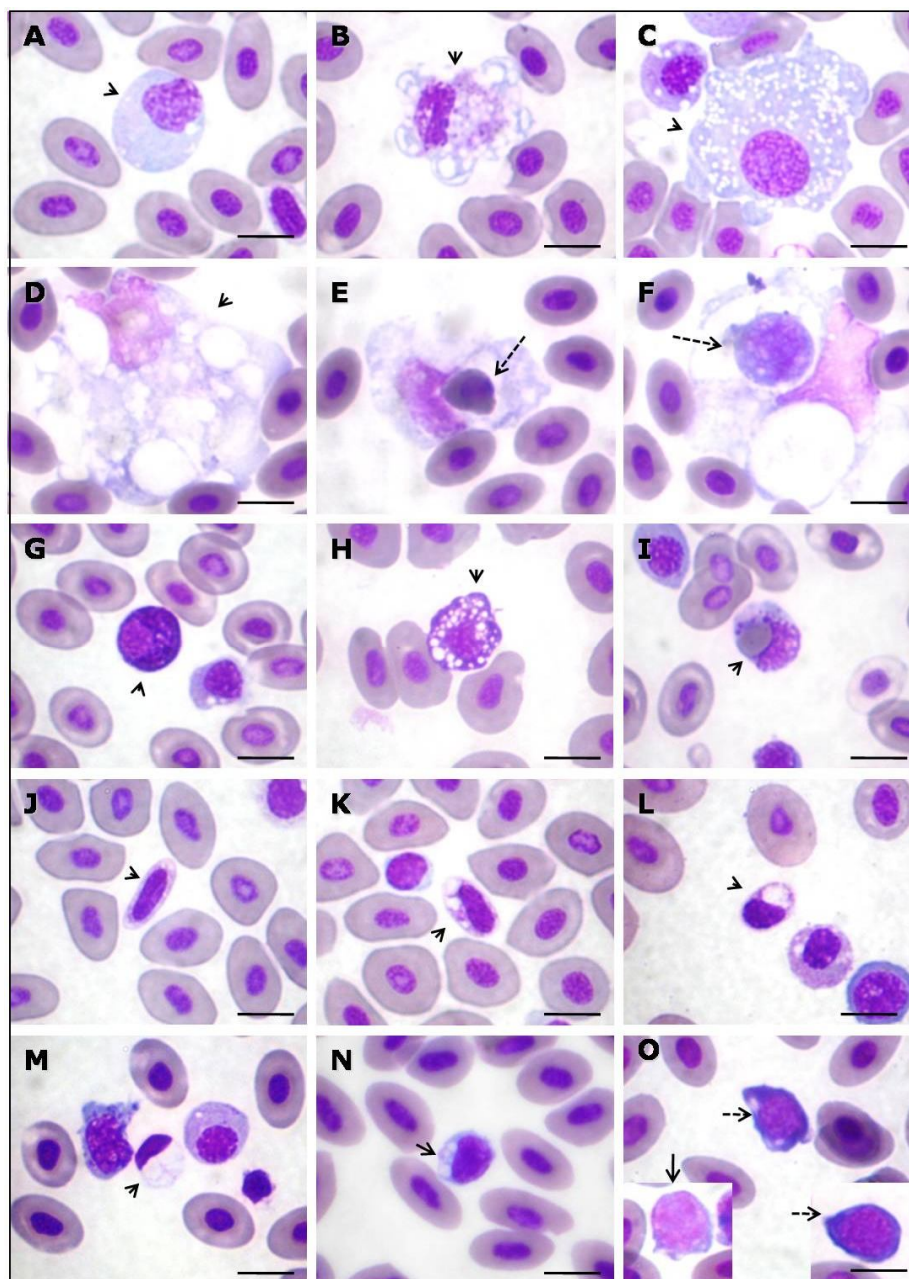
Figura 7. **(A)** Monócito com características normalmente observadas em *Pseudoplatystoma* sp. hígidos. **(B)** Monócito ativado de *Pseudoplatystoma* sp. **(C)** Monócito hiperativado de *Pseudoplatystoma* sp. **(D)** Monócito hiperativado de *C. auratus auratus*. **(E)** Eritrofagocitose em *C. auratus auratus*. **(F)** Leucofagocitose em *C. auratus auratus.* **(G)** Basófilo normal de *Pseudoplatystoma* sp. **(H)** Vacuolização citoplasmática em basófilo. **(I)** Basófilo parcialmente degranulado com inclusão citoplasmática (seta) compatível com eritroplastídeo. **(J)** Trombócito de *Pseudoplatystoma* sp. **(K)** Discreta vacuolização citoplasmática em trombócito. **(L)** Moderada vacuolização citoplasmática em trombócito. **(M)** Intensa vacuolização citoplasmática em trombócito. **(N)** Vacuolização citoplasmática em linfócito de *S. brasiliensis*. **(O)** Imunócitos (seta pontilhada) e linfócito normal (seta contínua) em *C. auratus auratus*. Coloração May Grünwald-Giemsa-Wright. Barra = 5 μm**.**

Considerações finais

A avaliação qualitativa das células sanguíneas em peixes permite inferências sobre a resposta das espécies frente aos desafios de cultivo, contribuindo também para estabelecer a funcionalidade dos leucócitos, efetivando-se como uma importante ferramenta para avaliação das condições sanitárias e dos parâmetros de defesa orgânica, fornecendo subsídios para estabelecer o prognóstico de peixes em condições patológicas.

A ocorrência de células em diferentes estágios de maturação é uma condição frequente em peixes teleósteos, embora existam alguns estudos sobre a hematopoése, ainda pouco se sabe sobre as espécies nativas. Dessa forma, são necessários estudos adicionais para esclarecer o mecanismo de formação e maturação das células sanguíneas nos peixes, principalmente, em espécies de importância zootécnica, para otimizar a utilização dos distúrbios morfológicos como uma ferramenta prognóstica e até mesmo diagnóstica em peixes de cultivo.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e SEAP pelo apoio financeiro ao Projeto AQUABRASIL (EMBRAPA); à FUNDECT pelo apoio financeiro ao projeto No 285/08 (Processo: 23/200.321/2008) e ao Dr. Marcos Tavares-Dias, pelas sugestões na elaboração deste capítulo.

Referências

AFONSO, A.; SILVA, J.; LOUSADA, S.; ELLIS, A.E.; SILVA, M.T. 1998. Uptake of neutrophils and neutrophilic components by macrophages in the inflamed peritoneal cavity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunol.*, 8:319–338.

ARKHIPCHUK, V. V.; GARANKO, N. N. 2005. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fishfin cells. *Ecotoxicol. Environ.l Safety*, 62:42–52.

BARNI, S.; BONCOMPAGNI, E.; GROSSO, A.; BERTONE, V.; FREITAS, I.; FASOLA, M.; FENOGLIO, C. 2007. Evaluation of *Rana* snk *esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquatic Toxicol.*, 81:45-54.

BIENZLE, D. 2000. Monocytes and macrophages. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. *Schalm´s veterinary hematology*. 5. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, p. 318-325.

BURROWS, A. S.; FLETCHER, T. C.; MANNING, M. J. 2001. Haematology of the turbot, *Psetta maxima* (L.): ultrastructural, cytochemical and morphological properties of peripheral blood leucocytes. *J. Appl. Ichthyol.*, 17:77-84.

CAR, B. D. 2000. Erythropoiesis and erythrokinetics. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. *Schalm´s veterinary hematology*. 5. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, p.105-109.

CLAUSS, T. M.; DOVE, A. D. M.; ARNOLD, J. E. 2008. Hematologic disorders of fish. *Vet. Clin. Exot. Anim.*, 11:445–462.

ELLIS, A. E. 1984. Bizarre forms of erythrocytes in a specimen of plaice, *Pleuronectes platessa* L. *J. Fish Dis.*, 7:411–414.

FRANCO, H. F. 1943. Amitose de eritroblastos e eritrócitos no sangue circulante de aves. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 38:73-79.

FIJAN, N. 2002. Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. *J. Fish Biol.*, 60:999-1014.

GRISOLIA, C. K.; STARLING, F. L. R. M. 2001. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mut. Res.*, 491:39–44.

GUIMARÃES, M. S.; ANDRADE, J. R. C.; FREITAS-ALMEIDA, A. C.; FERREIRA, M. C. 2002. *Aeromonas hydrophila* vacuolating activity in the Caco-2 human enterocyte cell line as a putative virulence factor. *FEMS Microbiol. Lett.*, 207:127-131.

JAIN, N. C. 1993. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 417.

LI, J.; BARREDA, D. R.; ZHANG, Y.-A.; BOSHRA, H.; GELMAN, A. E.; LAPATRA, S.; TORT, L.; SUNYER, J. O. 2006. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nature Immunology*, 7:1116-1124.

LIONGUE, C.; HALL, C. J.; O'CONNELL, B. A.; CROSIER, P.; WARD, A. C. 2009. Zebrafish granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling promotes myelopoiesis and myeloid cell migration. *Blood*., 113(11):2535-46.

MARTINS, M. L.; TAVARES-DIAS, M.; FUJIMOTO, R. Y.; ONAKA, E. M.; NOMURA, D. T. 2004. Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichtyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporini* (Nematoda: Anisakidae) in fish pond. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 56:640-646.

MARTINS, M. L.; MIYAZAKI, D. M. Y.; MORAES, F. R.; GHIRALDELLI, L.; ADAMANTE, W. B.; MOURIÑO, J. L. P. 2008. Suplementação com vitamina C e E influencia a resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus*. *Ciência Rural*, 38:213-218.

MOUCHET, F.; GAUTHIER, L.; MAILHES, C.; JOURDAIN, M. J.; FERRIER, V.; TRIFFAULT, G.; DEVAUX, A. 2006. Biomonitoring of the genotoxic potential of aqueous extracts of soils and bottom ash resulting from municipal solid waste incineration, using the comet and micronucleus tests on amphibian (Xenopus laevis) larvae and bacterial assays (Mutatox® and Ames tests). *Science Total Enviro.*, 355:232–246.

MURAD, A.; EVERILL, S.; HOUSTON, A. H. 1993. Division of goldfish erythrocytes incirculation. *Canadian Journal of Zoology* 71:2190–2198.

RANZANI-PAIVA, M. J. T. 1995. Células do sangue periférico e contagem diferencial de leucócitos de tainha *Mugil platanus* Gunther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunar de Cananéia – SP. (Lat. 25º00'S – Long. 47º55'W). *B. Int. Pesca.*, 22:23-40.

RANZANI-PAIVA, M. J. T. 2007. Hematologia como ferramenta para avaliação da saúde de peixes. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES, 2., 2007, Botucatu. *Anais...*. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, p. 47-51.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ISHIKAWA, C. M.; EIRAS, A. C.; SILVEIRA, V. R. 2004. Effects of an experimental challenge with *Mycobacterium marinum*

on the blood parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). *Braz. Arch. Biol. Tech.*, 47:945-953.

SCHULTZE, A. E. 2000. Interpretation of canine leukocyte responses. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. *Schalm´s veterinary hematology*. 5. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, p. 366-381.

SHAO, J.-Z.; LIU, J.; XIANG, L.-X. 2004. *Aeromonas hydrophila* induces apoptosis in *Carassius auratus* lymphocytes in vitro. *Aquaculture*, 229:11–23.

SMITH, G. S. 2000. Neutrophils. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. *Schalm´s veterinary hematology*. 5. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, p. 281-296.

STOSIK, H.; DEPTULA, W.; TRAVNICEK, M. 2001. Studies on the number and ingesting ability of thrombocytes in sick carps (*Cyprinus carpio*). *Vet. Med. Czech.*, 46:12–16.

TAVARES-DIAS, M.; BARCELLOS, J. F. M. 2005. Peripheral blood cells of the armored catfish *Hoplosternum littorale* Hancock, 1828: a morphological and cytochemistry study. *Braz. J. Morph. Sci.*, 22:215-220.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2004. *Hematologia de peixes teleósteos*. Ribeirão Preto: Villimpress, p. 143.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2007. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf.), with an assessment of morphological, cytochemical, and ultrastructural features. *Vet. Clin. Pathol.*, 36:49-54.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. 2008. Hematological assessment in four Brazilian teleost fish with parasitic infections, collected in freefishing from Franca, São Paulo, Brazil. *Bol. Inst. Pesca*, 34:189-196.

TAVARES-DIAS, M.; ONO, E. A.; PILARSKI, F.; MORAES, F. R. 2007.Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. *J. Appl. Ichthyol.*, 23:709–712.

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 14

Indicadores fisiológicos de estresse em peixes expostos ao peróxido de hidrogênio (H_20_2)

Elizabeth Affonso, Flávia Pinheiro de Barros, Elenice Martins Brasil, Marcos Tavares-Dias & Eduardo Akifumi Ono

Resumo

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tem sido usado no controle de doenças parasitárias e infecciosas. Porém, não existem informações sobre os efeitos desse produto nos peixes nativos da Amazônia, somente em peixes de clima temperado e alguns desses estudos serão relatados neste capítulo. Neste, foram avaliados também os efeitos de diferentes concentrações subletais de H_2O_2 nas respostas fisiológicas de juvenis de tambaqui Colossoma macropomum, expostos a 0, 42, 84 e 126 mg/L de H_2O_2, com 3 réplicas cada, durante 30 minutos. Foram feitas coleta de sangue antes do experimento (basal), imediatamente após o banho com H_2O_2 e 24 horas após a recuperação. Foram determinados as concentrações de glicose plasmática e os parâmetros hematológicos: hematócrito (Ht), concentração de hemoglobina ([Hb]), número de eritrócitos (RBC), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Os parâmetros hematológicos não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. Entretanto, as concentrações de glicose plasmática foram significativas ($p<0,05$) nos tratamentos com e sem H_2O_2, e retornaram aos valores basais após 24 horas de recuperação. A sobrevivência de 100% dos animais e o retorno à homeostase fisiológica sugere que tais concentrações podem ser empregadas sem prejuízo à saúde do tambaqui. Além disso, estes resultados foram comparados e discutidos com outras espécies descritas na literatura. Sugere-se que H_2O_2 seja avaliado como quimioterápico para o tambaqui, bem como também para outras espécies após realização de teste de toxicidade e avaliação fisiológica.

Abstract

The hydrogen peroxide (H_2O_2) has been used to control of fish parasites and bacterial infections. However, no information on the secondary effects of this product on Amazon fish is available, only to fish species from temperate climate and some of these studies were reported in this chapter. In this chapter study, was also evaluated the effect of a 30-min therapeutical bath of hydrogen peroxide at 0, 42, 84 e 126 mg H_2O_2/L on the physiological response of juvenile tambaqui, Colossoma macropomum. Blood samples were collected before (basal), immediately after and 24 hours after (recovery) the hydrogen peroxide bath. The concentrations of plasmatic glucose and the hematological parameters were determined: blood hematocrit (Ht), hemoglobin (Hb), red blood cell count (RBC), mean cell volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentrations (MCHC). The hematological parameters presented no significant differences among treatments. However, the plasmatic glucose concentrations were significantly higher ($p<0.05$) in the treatments with and without hydrogen peroxide, and returned to basal values after 24 hours. The survival rate of 100% and recovering of physiological homeostasis suggest that the concentrations tested are harmless to tambaqui. Furthermore, these results were compared and discussed with other fish species from literature. This product should be evaluated as chemotherapeutants for the tambaqui, as well as for other fish species after studies of toxicity and physiological evaluation.

Introdução

Na aquicultura, uma ampla variedade de substâncias químicas pode ser usada no controle de ectoparasitos, entretanto, o uso indiscriminado de alguns destes produtos tem tornado os parasitos resistentes (Sitjà-Bobadilla et al., 2006). O uso indiscriminado de produtos nesta atividade de produção tem aumentado, tornando-se um risco em potencial para o meio ambiente, para os organismos aquáticos e para a saúde do homem (Martins, 2004; FAO, 2005; Maximiano et al., 2005; Winkaler, 2008). Por isso, são necessários estudos que avaliem esses riscos e que possam garantir não somente os benefícios ao produtor, mas a segurança dos recursos hídricos, da comunidade aquática e do homem.

No Brasil, não há uma legislação específica para uso de quimioterápicos para o setor aquícola e tampouco produtos com registros para este fim, os quais são avaliados apenas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Assim, as pesquisas sobre os produtos quimioterápicos aprovados e seguros deveriam ser repassadas para o setor produtivo. Para isso, considera-se relevante os estudos sobre a toxicidade desses produtos, principalmente, para as espécies de importância econômica para o país.

Em 1994, a FDA (Food and Drug Administration), designou o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como um novo quimioterapêutico para peixes, desde que usado em baixas concentrações (250-500 mg/L) para controlar fungos em todas as espécies e nos diferentes estágios de vida, inclusive ovos. Foram realizados estudos para avaliar a segurança deste produto em diferentes espécies de peixes de clima temperado e, para espécies altamente sensíveis, foi proposto concentração de 100 mg/L H_2O_2 como dosagem terapêutica

(Tripi & Bowser, 2001). Este produto vem sendo usado não só pela sua eficácia no tratamento contra infecções causadas por fungos (Howe et al., 1999; Rach et al., 2004) e bactérias (Thomas-Jinu & Goodwin, 2004; Avendaño-Herrera et al., 2006), mas também no tratamento e controle de outros parasitos com Monogenoidea (Mansell et al., 2005; Sitjà-Bobadilla et al., 2006; Hutson et al., 2007) e protozoários (Howe et al., 1999; Rach et al., 2000). Além disso, o H_2O_2 representa uma alternativa terapêutica não prejudicial ao meio ambiente, devido a sua rápida decomposição em gás oxigênio na água (Kiemer & Black, 1997; Bowers et al., 2002; Tort et al., 2003; Avendaño-Herrera et al., 2006).

Apesar da eficácia dos terapêuticos contra os parasitos, estes podem ser também prejudiciais ao hospedeiro quando o produto usado apresenta uma estreita margem terapêutica (Howe et al., 1999; Avendaño-Herrera et al., 2006). Concentrações elevadas de H_2O_2 são tóxicas para peixes jovens (Tripi & Bowser, 2001; Thomas-Jinu & Goodwin, 2004; Avendaño-Herrera et al., 2006) e pode(m) causar danos aos tecidos branquiais (Johnson et al., 1993; Kiemer & Black, 1997; Tripi & Bowser, 2001) e na fisiologia dos peixes.

Existe uma correlação importante entre o tempo de exposição ao peróxido de oxigênio e os danos causados aos tecidos das brânquias, sendo que a maioria dos danos ocorre na extremidade da lamela secundária e em outras partes dos arcos branquiais (Kiemer & Black, 1997; Johnson et al., 1993). Portanto, esta habilidade do H_2O_2 é um fator determinante para a realização de testes de toxicidade aguda, pois este proporciona respostas rápidas dos efeitos letais deste quimioterápico para os peixes.

A avaliação de parâmetros sanguíneos em animais é uma rotina, bem como ferramenta importante na prática da veterinária clínica médica. Esta técnica simples pode prover essencial informação sobre o estado fisiológico dos animais e então ajudar o clínico a tomar decisões médicas. Em peixes, o uso de parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos tem apresentado bons resultados na avaliação dos efeitos de quimioterápicos (Tort et al., 2003; Winkaler, 2008). Isso é possível porque o peixe, sob efeito de um agente estressor, desencadeia respostas denominadas repostas ao estresse que podem ser divididas em primárias, secundárias e terciárias (Wedemeyer, 1996; Barton, 2002). As respostas primárias são mediadas pelos hormônios catecolaminas e cortisol que atingem todo o organismo, provocando os efeitos secundários. As respostas secundárias compreendem os vários efeitos bioquímicos e fisiológicos associados com o estresse, tais como: hiperglicemia, aumento das proteínas totais, modificação hematológica, íons plasmáticos, que podem ser utilizados como diagnóstico auxiliar na avaliação das condições de saúde do peixe (Affonso et al., 2002; Menezes et al., 2006; Andrade et al., 2007). As respostas terciárias atingem o organismo como um todo, comprometendo crescimento, reprodução e o sistema imunológico do organismo.

Em trutas *Oncorhynchus mykiss* expostos à concentração de 500 mg/L de H_2O_2 houve aumento do hematócrito, dos níveis de hemoglobina e catecolamina, mas essas alterações não ocorreram em peixes expostos a 100 mg/L (Powell & Perry, 1997). Em *Salmo salar*, banho de 20 minutos com 1500 mg/L de H_2O_2 causou aumento na concentração plasmática de cortisol, glicose, cloreto, potássio e sódio, mas sem alterações teciduais nas brânquias (Bowers et al., 2002). Em *Seriola lalandi*, parasitismo por Monogenoidea

Zeuxanpta seriolae causou redução na concentração de hemoglobina e aumento dos níveis de lactato e osmolaridade, mas banho de 10 minutos com 300 mg/L de H_2O_2 causou estresse agudo. Porém, este tratamento foi menos prejudicial para o peixe que os efeitos da persistência crônica do parasito, como indicado pelas alterações dos níveis lactato e osmolaridade (Mansell et al., 2005). Portanto, parâmetros hematológicos podem ser usados como bioindicadores de estresse causado pela toxicidade do H_2O_2 nos peixes (Tort et al., 2003), principalmente nas espécies mais sensíveis a esse químico.

Com a intensificação da aqüicultura brasileira, as elevadas densidades de estocagem praticadas têm contribuído para a dispersão de agentes infecciosos e parasitários em tambaqui *Colossomoma macropomum* (Cuvier, 1818), peixe de grande importância para a aqüicultura, principalmente, na região Norte, onde é a espécie mais cultivada (IBAMA, 2008). Nesta espécie, têm sido relatadas infecções causadas, principalmente, por Monogenoidea (Békési, 1992; Eiras et al., 1995; Martins et al., 2000; Varela et al., 2003; Tavares-Dias et al., 2006), *Ichthyophthirius multifiliis* (Martins et al., 2000; Tavares-Dias et al., 2006), *Trichodina* sp. (Eiras et al., 1995; Martins et al., 2000), bactérias e fungos (Békési, 1992; Martins & Romero, 1996; Martins et al., 2000), prejudicando a saúde dos animais e a produção. Assim, o tambaqui foi a espécie escolhida para este estudo, e o H_2O_2 o quimioterápico, por ser de grande potencialidade para uso na aquicultura da região Norte e amazônica.

Métodos de estudos de indicadores de estresse em tambaqui *Colossoma macropomum*

Obtenção e manutenção dos peixes

Os espécimes de tambaqui foram obtidos de um piscicultor local com aproximadamente 7 cm e transportados para a Estação Experimental de Piscicultura da Coordenação de Pesquisas em Aqüicultura (CPAQ/INPA, AM, Brasil). Foram mantidos em viveiro escavado por dois meses e alimentados duas vezes ao dia com ração comercial. Cento e vinte peixes com peso de 29,8 ± 4,94 g e 11,05 ± 0,6 cm de comprimento foram distribuídos em 2 tanques de polietileno de 500 L, antes do início dos experimentos.

Avaliação da toxicidade aguda ao H_2O_2

Para definir as concentrações de H_2O_2 letais para o tambaqui, previamente foi realizado um teste de toxicidade a este composto, no qual 20 juvenis de tambaquis foram mantidos em jejum por 24 horas para esvaziamento do trato gastro-intestinal e, em seguida, distribuídos aleatoriamente em 4 aquários de 40 L com cinco peixes cada, mantidos sob aeração constante e sistema estático. Após este período, os peixes foram expostos a concentrações de 84, 126, 168 e 336 mg/L de H_2O_2 em solução aquosa a 30% (Merck®), durante o período máximo de 85 minutos, para determinação da taxa de mortalidade.

Exposição às diferentes concentrações subletais de H_2O_2 para avaliação fisiológica

Após definidas as concentrações letais de H_2O_2 para o tambaqui, cento e vinte juvenis foram distribuídos aleatoriamente em 12 aquários de 80 L com aeração constante, perfazendo um total de 4 grupos, foram mantidos em aclimatação e jejum, durante 24 horas. O sistema de exposição usado foi o estático e todos os tratamentos, incluindo o controle, foram realizados em triplicata, com 10 indivíduos por aquário. Após este período, a aeração dos aquários foi suspensa e imediatamente adicionado 0, 42, 84 e 126 mg/L de H_2O_2 por 30 minutos. O comportamento dos peixes foi avaliado durante o banho com H_2O_2, e a sobrevivência no período de recuperação.

Em seguida, 5 peixes de cada tratamento e suas réplicas, foram randomicamente selecionados para coleta de sangue e os demais foram transferidos para tanques de 500 L com aeração constante e fluxo contínuo de água para observar a recuperação de 24 horas. Após este período, amostras de sangue foram coletadas para as análises hematológicas.

Coleta de sangue e análises hematológicas após exposição ao H_2O_2

Antes da coleta de sangue, os peixes foram anestesiados com benzocaína (60%) e, em seguida, após a devida contenção, uma amostra de sangue foi coletada por punção do vaso caudal com seringas contendo o anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) a 10%. As amostragens foram feitas antes (basal), após o banho e 24 h de recuperação ao H_2O_2. As amostras de sangue foram destinadas à determinação dos seguintes parâmetros sanguíneos: hematócrito (Ht) determinado pelo método de microhematócrito, concentração da hemoglobina [Hb] determinada pelo método da cianometahemoglobina, contagem de eritrócitos totais (Red Blood Cell Count/RBC) realizada em câmara de Neubauer, após diluição em solução de Natt & Herrick (1952). Com estes resultados, foram calculados o volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). A amostra de sangue foi centrifugada para obtenção de plasma e determinação da glicose pelo método enzimático-colorimétrico (glicose oxidase), utilizando kit comercial (Doles®, GO).

Monitoramento da qualidade de água

Os parâmetros de qualidade da água (concentrações de oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade, pH e concentrações de amônia total e nitrito), foram medidos antes e após 20 minutos de exposição ao H_2O_2. Os níveis de oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade foram determinados utilizando oxímetro digital, e o potencial hidrogeniônico foi medido com um pH-metro digital. As concentrações de amônia total (NH_3 + NH_4^+) e nitrito (NO_2) foram determinadas por método colorimétrico segundo Verdouw et al. (1978) e Boyd & Tucker, (1992), respectivamente. As concentrações de H_2O_2 na água dos aquários foram determinadas por titulação com solução ácida de permanganato de potássio, segundo Vogel (1981).

Resultados em tambaquis expostos ao peróxido de hidrogênio

A - Parâmetros físico-quimicos e sobrevivência dos peixes

Os resultados da avaliação da toxicidade do H_2O_2 em juvenis de tambaqui estão representados na Tabela 1. O tempo máximo de sobrevivência dos peixes expostos em 168 mg/L de H_2O_2 foi 85 minutos, reduzindo para 20 minutos quando expostos a 336 mg/L. Nas menores concentrações não houve mortalidade dos peixes neste período estudado (Tabela 1). A partir destes resultados, foi decidido que a maior concentração testada para avaliar os parâmetros sanguíneos seria 126 mg H_2O_2/L.

Os resultados dos parâmetros de qualidade da água para os 4 tratamentos foram verificados mediante a análise de variância (ANOVA One Way). Quando os tratamentos apresentaram diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os valores dos parâmetros físicos e químicos da água dos aquários, antes e após 20 minutos da adição de H_2O_2, estão representados na Tabela 1. Condições normóxicas foram observadas nos diferentes tratamentos, mas um pequeno aumento, proporcional à concentração de H_2O_2, foi observado, porém não significativo. Os valores de pH, após a adição de H_2O_2 foram significativamente ($p<0,05$) elevados em relação ao controle. Ao contrário, as concentrações de amônia total foram significativamente ($p<0,05$) menores após adição do H_2O_2 nos tratamentos.

Tabela 1. Avaliação da mortalidade e tempo de sobrevivência de juvenis de *C. macropomum* expostos a diferentes concentrações de H_2O_2.

Concentração de H_2O_2	Mortalidade	Tempo de sobrevivência
0 mg/L	0%	85 min
84 mg/L	0%	85 min
126 mg/L	0%	85 min
168 mg/L	100%	85 min
336 mg/L	100%	20 min

Tabela 2. Parâmetros físicos e químicos da água dos aquários antes (1) e após 20 minutos (2) da adição de 0; 42,0; 84,0 e 126 mg/L de H_2O_2. Valores expressam as médias ± desvio padrão.

Parâmetros	Concentrações de H_2O_2 (mg/L)			
	0,0	42,0	84,0	126,0
O_2 mg/L (**1**)	5,84±0,3	5,89±0,18	5,98±0,07	6,07±0,1
O_2 mg/L (**2**)	5,79±0,25	6,33±0,07	6,48±0,23	6,5±0,35
T°C (**1**)	27,27±0,12	27,23±0,22	27,07±0,06	27,1±0,1
T°C (**2**)	27,43±0,4	27,23±0,2	27,0±0	26,77±0,06
pH (**1**)	6,63±0,2	6,81±0,04[b]	$6{,}96\pm0{,}07_b$	6,99±0,04[b]
pH (**2**)	6,32±0,7	7,03±0,06[a]	7,11±0,15[a]	7,02±0,17[a]
Cond µS/cm (**1**)	22,83±1,1	22,23±0,7	21,3±0,17	21,57±0,64
Cond µS/cm (**2**)	16,63±0,12	23,67±0,65	23,03±0,4	23,8±2,6
Amônia mg/L (**1**)	0,94±0,07	0,87±0,14[a]	0,83±0,15[a]	0,77±0,08[b]
Amônia mg/L (**2**)	1,06±0,07	0,63±0,17[b]	0,27±0,08[b]	0,23±0,24[b]
Nitrito mg/L (**1**)	0,0102±0,005	0,0101±0,003	0,008±0,001	0,011±0,001
Nitrito mg/L (**2**)	0,009±0,005	0,005±0,0002	0,0046±0,0002	0,0053±0,0005

*:diferenças significativas ($p<0,05$); Cond: Condutividade elétrica; O_2: Oxigênio dissolvido.

As concentrações de H_2O_2 na água, após adição de 42, 84 e 126 mg/L, estão representados na Figura 1. Os resultados demonstraram que as diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio permaneceram constantes durante 20 minutos de banho.
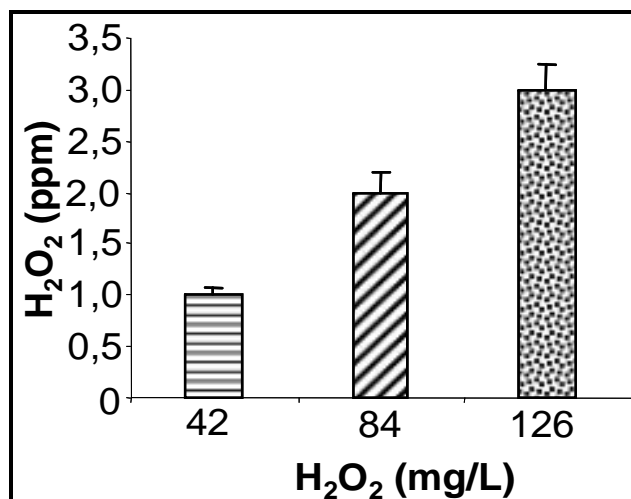
Figura 1. Concentrações de H_2O_2 na água, nos diferentes tratamentos, após 20 minutos de banho.

B - Parâmetros hematológicos

Os resultados dos parâmetros sanguíneos foram verificados mediante a análise de variância (ANOVA One Way). Quando os tratamentos apresentaram diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os valores correspondentes aos parâmetros eritrocitários dos peixes expostos a diferentes concentrações (0, 42, 84 e 126 mg/L de H_2O_2) estão representados na Figura 2. Não houve diferenças significativas ($p<0,05$) entre os tratamentos. Entretanto, observam-se variações nos valores encontrados quando se compara as situações: antes, após 30 min de exposição e 24 horas de recuperação ao H_2O_2. Foram encontrados valores mais elevados de Ht, Hb, RBC e VCM em todos os tratamentos, inclusive o controle, no período de 30 minutos após o banho com H_2O_2 em comparação com os valores basais.

No presente estudo, um aumento significativo ($p<0,05$) nos níveis de glicose plasmática de juvenis de tambaqui foi verificado em todos os tratamentos durante o banho com e sem (controle) adição de H_2O_2 em relação aos valores basais (antes do banho) e, após 24 horas de recuperação, retornaram ao estado inicial (Figura 3). Entretanto, um aumento nos níveis de glicose foi observado nos indivíduos do banho com H_2O_2 em relação ao controle.
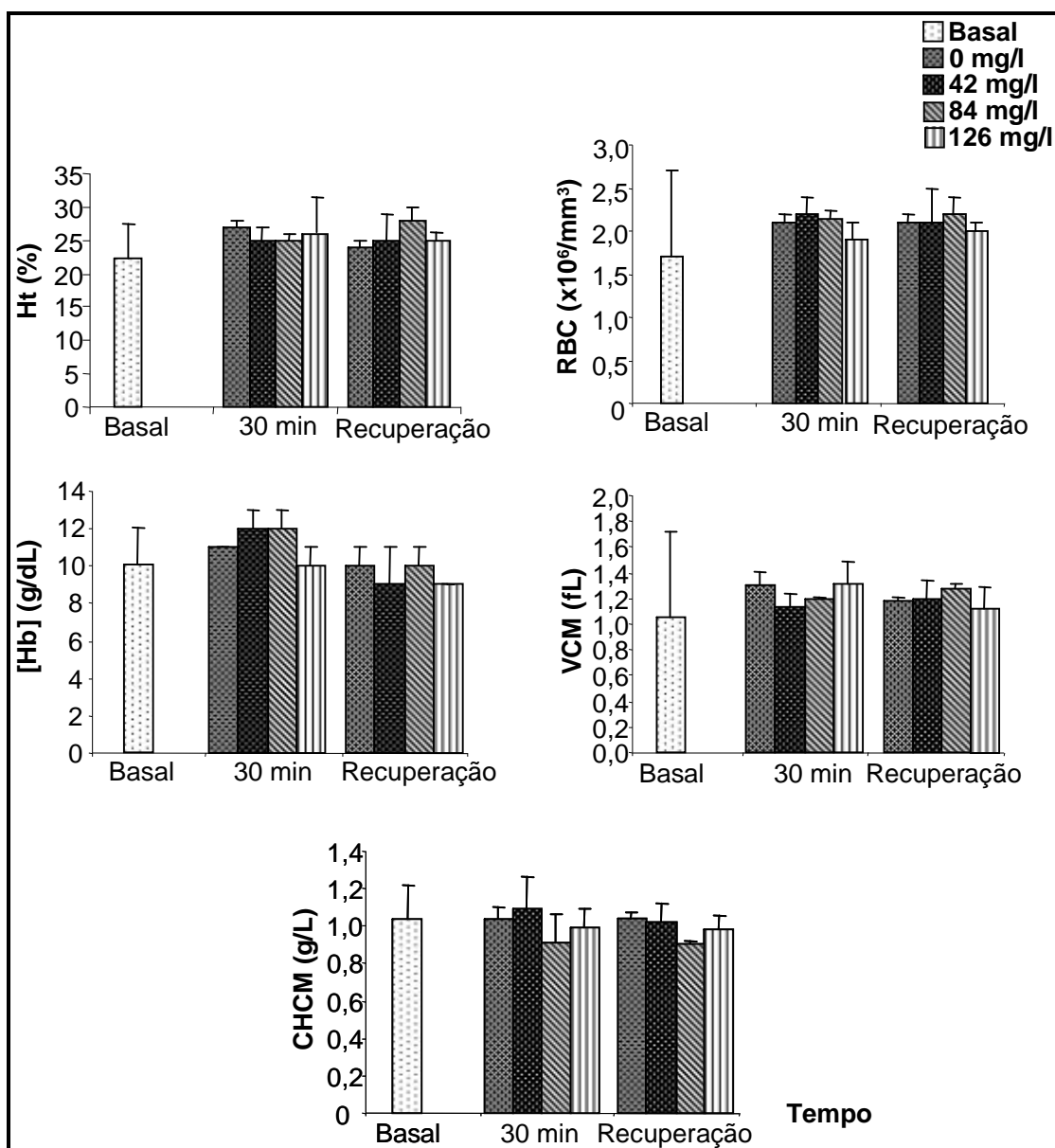
Figura 2. Hematócrito (Ht), número de eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em *C. macropomum* antes e após 30 min de banho com 0, 42, 84 e 126 mg/L de H_2O_2 e 24 h de recuperação. Valores expressam as médias ± desvio padrão.
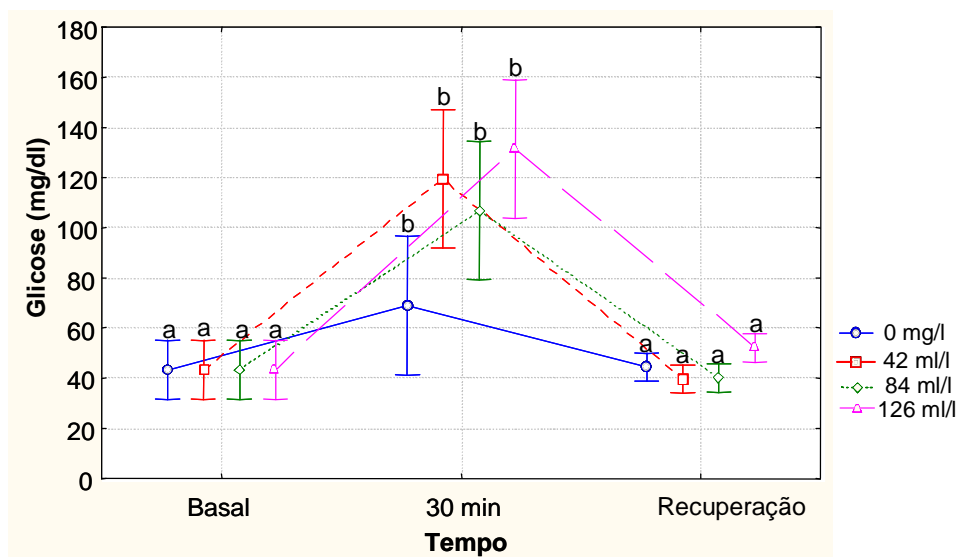
Figura 3. Concentrações de glicose plasmática de *C. macropomum* antes do tratamento (basal), após 30 min de banho com 0, 42, 84 e 126 mg/L de H_2O_2 e 24 horas de recuperação. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p<0,05$) entre os valores basais e os tratamentos. Valores são médias ± desvio padrão.

Em *Salmo salar* e *Oncorhynchus tshawytscha*, a toxicidade do H_2O_2 além de aumentar com a concentração e tempo de exposição ao produto também é influenciada pelo aumento da temperatura da água (Johnson et al., 1993). Assim, em ensaios laboratoriais, é necessário o acompanhamento da qualidade da água dos tanques experimentais, pois a variação em um dos parâmetros físico-químicos pode interferir nos resultados (Affonso et al., 2007; Andrade et al., 2007), principalmente em exposição ao H_2O_2. No presente estudo, oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade e nitrito não apresentaram diferenças significativas nos diferentes tratamentos durante todo o período experimental. Entretanto, os valores de pH da água dos peixes expostos ao H_2O_2 foram significativamente ($p<0,05$) mais elevados em comparação àqueles do controle, independente da concentração do produto. Essas alterações podem ser explicadas em função da decomposição do H_2O_2 na água, liberando os íons OH^-, que, consequentemente, aumentam o pH.

A amônia na água é um dos principais compostos que pode causar prejuízo à saúde dos peixes. Esse composto pode ser encontrado na forma de íon amônio (NH_4^+) ou amônia (NH_3^-), sendo o pH o principal fator que determina a proporção dessas duas formas na água; quanto maior o pH, maior será a porcentagem de amônia tóxica (NH_3^-). No presente estudo, a adição do H_2O_2 na água causou uma diminuição significativa ($p<0,05$) na concentração de amônia em relação ao controle (sem H_2O_2). Esta redução

pode ser explicada pelo processo de oxidação sofrido pela amônia, com sua transformação para nitrito e deste para nitrato, conforme verificado pela diminuição nas concentrações de nitrito. Apesar destas alterações, todos os parâmetros físico-químicos analisados estão dentro dos limites considerados adequados para o desenvolvimento e saúde dos peixes tropicais (Kubitza, 2003).

Os parâmetros hematológicos, sob efeito de um agente estressor, podem apresentar uma hemoconcentração ou hemodiluição dos eritrocitos. Hemoconcentração ocorre como estratégia para aumentar a capacidade de transporte de oxigênio no sangue em situações de estresse, onde a demanda de energia é elevada (Caldwell & Hinshaw, 1994; Carvalho & Fernandes, 2006), ou pode ser apenas uma alteração temporária frente à desidratação. Agentes estressores que podem comprometer a absorção do ferro, levar à malformação ou hemólise dos eritrócitos, à inibição da síntese de hemoglobina ou à competição pelo sítio de ligação do oxigênio, podem causar hemodiluição ou anemia nos peixes, reduzindo a capacidade de transporte de oxigênio para os tecidos (Heath, 1995; Affonso et al., 2002; Jung et al., 2003; Das et al., 2006).

No presente estudo, os parâmetros hematológicos (Ht, Hb, RBC, VCM e CHCM) de *C. macropomum* exposto por 30 minutos em banhos de 42, 84 e 126 mg/L de H_2O_2 não foram alterados em função do produto. Similarmente, banhos curtos ou prolongados com concentrações de 10 ou 100 mg/L de H_2O_2 não influenciaram os valores da concentração de hemoglobina e hematócrito em *Ictalurus punctactus* (Tort et al., 2003). De acordo com esses autores, a avaliação dos efeitos do estresse por meio de parâmetros sanguíneos é mais efetiva quando o H_2O_2 é usado para tratamento de espécies sensíveis ao produto (Tort et al., 2003) ou sob efeito de altas concentrações.

A hiperglicemia é uma reposta característica dos peixes sob estresse agudo ou crônico (Wedemeyer, 1996). Em tambaqui *C. macropomum*, aumento significativo ($p<0,05$) da concentração de glicose plasmática foi verificado em todos os tratamentos durante os banhos com e sem H_2O_2 em relação aos valores basais e retornaram a estes valores após 24 horas de recuperação ao produto. O efeito tóxico do peróxido de hidrogênio, segundo Kiemer & Black (1997), pode danificar as brânquias dos peixes, dependendo do tempo de exposição a este composto. No presente estudo, 30 minutos de banho nos diferentes tratamentos não foi suficiente para causar mortalidade, entretanto, foi observado sinal típico de estresse nos peixes, tal como subidas constantes à superfície da lamina d’água do aquário. Entretanto, a diminuição da glicose aos valores basais, durante a recuperação, é um indício de que tais concentrações de H_2O_2 testadas não comprometem a sobrevivência dos peixes.

Considerações finais

O peróxido de hidrogênio é um dos produtos químicos aprovados pela USA Food and Drug Administration (FDA) para uso na aquicultura, devido a sua comprovada eficácia no tratamento contra bactérias, fungos e ectoparasitos de peixes e, praticamente por não causar impactos ambientais. Os resultados obtidos sugerem que o peróxido de hidrogênio, em banhos de 30 minutos nas concentrações de 42, 84 e 126 mg/L de H_2O_2 pode ser

empregado sem comprometer a sobrevivência do tambaqui. Entretanto, é necessário que futuros estudos sejam realizados com peixes infectados por parasitos ou bactérias e fungos, para avaliar qual das concentrações seria mais eficaz no tratamento de tambaquis infectados. Embora determinada concentração de H_2O_2 seja letal para o tambaqui, esta poderá não eliminar e nem controlar alguns agentes patogênicos para essa espécie.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa PQ, concedida a M. Tavares-Dias (Processo: 300472/2008-0).

Referências

AFFONSO, E. G.; POLEZ, V. L. P.; CORRÊA, C. F.; MAZON, A. F.; ARAÚJO, M. R. R.; MORAES, G.; RANTIN, F. T. 2002. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol*., 133: 375-382.

AFFONSO, E. G.; SILVA, E. C.; TAVARES-DIAS, M.; MENEZES, G. C.; CARVALHO, C. S.; NUNES, E. S. S.; ITUASSÚ, D. R.; ROUBACH, R.; ONO, E. K.; FIM, J. D. I.; MARCON, J. L. 2007. Effect of high levels of dietary vitamin C on the blood responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 147A:383–388.

ANDRADE, J. I. A.; ONO, E. A.; MENEZES, G. C.; BRASIL, E. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E. G. 2007. Influence of diets supplemented with vitamin C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. *Comp. Bioch. Physiol*., 146A: 576-580.

AVENDAÑO-HERRERA, R.; MAGARIÑOS, M.; MAGARIÑOS, R.; TORANZO, A. E. 2006. Use of hydrogen peroxide against the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* and its effect on infected turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture,* 257: 104-110.

BARTON, B. A. 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integ. Comp. Biol.*, 42: 517-525.

BÉKÉSI, L. 1992. Evaluation of data on ichthyopathological analyses in the Brazilian northeast. *Ciên. Cult.*, 44: 400-403.

BOYD, E.; TUCKER, C. S. 1992. Walter quality and pond soil analyses for aquaculture. Auburn: Alburn University.

BOWERS, J. M.; SPEARE, D. J.; BURKA, J. F. 2002. The effects of hydrogen peroxide on the stress response of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 25:311–313.

CALDWELL, C. A.; HINSHAW, J. 1994. Physiological and haematological responses in rainbow trout subjected to supplemental dissolved oxygen in fish culture. *Aquaculture,* 126:183–193.

CARVALHO, C. S.; FERNANDES, M. N. 2006. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture*, 251:109-117.

DAS, P. C.; AYYAPPAN, S.; JENA, J. K. 2006. Haematological changes in the three Indian major carps, *Catla catla* (Hamilton), *Labeo rohita* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) exposed to acidic and alkaline water pH. *Aquaculture*, 256:80-87.

EIRAS, J. C.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ISHIKAWA, C. M.; ALEXANDRINO, A. C.; EIRAS, A. C. 1995. Ectoparasites of semi-intensively farmed tropical freshwater fish *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* and *Colossoma macropomum*. *Bull. Europ. Assoc. Fish Pathol.*, 148-51.

FAO. 2005. *Responsible use of antibiotics in aquaculture*. Roma, 110 p. Fisheries Technical paper.

HEATH, A. G. 1995. *Water pollution and fish physiology*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 354p.

HOWE, G. E.; GINGERRICH, W. H.; DAWSON, V. K.; OLSON, J. J. 1999. Efficacy of hydrogen peroxide for treating saprolegniasis in channel catfish. *J. Aqua. Anim. Health,* 222-230.

HUTSON, K. S.; ERNST, I.; WHITTINGTON, I. D. 2007. Risk assessment for metazoan parasites of yellowtail kingfish *Seriola lalandi* (Perciformes: Carangidae) in South Australian sea-cage aquaculture. *Aquaculture*, 271:85-99.

IBAMA. 2008. *Estatística da Pesca 2006 Brasil*: Grandes Regiões e Unidades da Federação. Brasília-DF.

JOHNSON, S. C.; CONSTIBLE, J. M.; RICHARD, J. 1993. Laboratory investigations on the efficacy of hydrogen peroxide against the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and its toxicological and histopathological effects on Atlantic salmon *Salmo salar* and chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha. Dis. Aquat. Org*., 17:197-204.

JUNG, S. H.; SIM, D. S.; MI-SEON PARK, M. S.; JO, K.;YOON KIM, Y. 2003. Effects of formalin on haematological and blood chemistry in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquac. Res*., 34:1269-1275.

KIEMER, M. C. B.; BLACK, K. D. 1997. The effects of hydrogen peroxide on the gill tissues of Atlantic salmon, *Salmon salar* L. *Aquaculture*, 153: 181-189.

KUBITZA, F. 2003. *Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões*. Jundiaí, São Paulo, 229 p.

MANSELL, B.; POWELL, M. D.; ERNST, I.; NOWAK, B. F. 2005. Effects of the gill monogenean *Zeuxapta seriolae* (Meserve, 1938) and treatment with hydrogen peroxide on pathophysiology of kingfish, *Seriola lalandi* Valenciennes,1833. *J. Fish Dis*., 28:253–262.

MARTINS, M. L; ROMERO, N. G. 1996. Efectos del parasitismo sobre el tejido branquial en peces cultivados: Estúdio parasitológico e histopatologico. *Revta Bras. Zool*., 13:489- 500.

MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; FUJIMOTO, R. Y.; ONAKA, E. M.; NOMURA, D. T.; SILVA, C. A. H.; SCHALCH, S. H. C. 2000. Parasitic infections in cultivated freshwater fishes. A survey of diagnosticated cases from 1993 to 1998. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.,* 9:23-28.

MARTINS M. L. 2004. Cuidados básicos e alternativos no tratamento de enfermidades de peixes na aquicultura brasileira. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. A. P. (Ed.). *Sanidade de Organismos Aquáticos*. São Paulo: Livraria Varela, p. 357-370.

MAXIMIANO, A. A.; FERNADES, R. O.; NUNES, F. P.; ASSIS, M. P.; MATOS, R. V.; BARBOSA, C. G. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. 2005. Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicas e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos a saúde humana e ambiental. *Ciên. Saúde Col*., 10:483-491.

MENEZES, G. C.; TAVARES-DIAS, M.; ONO, E. A.; ANDRADE, J. I. A.; BRASIL, E. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E. G. 2006. The influence of dietary vitamin C and E suplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. *Comp. Biochem. Physiol*., 145A: 274-279.

NATT, M. P.; HERRICK, C. A. 1952. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Science*, 735-738.

POWELL, M. D.; PERRY, S. P. 1997. Respiratory and acid-base pathophysiology of hydrogen peroxide in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquatic Toxicol.*, 37:99-112.

RACH, J. J.; GAIKOWSKIA, M.; PRAMSAY, . 2000. Efficacy of hydrogen peroxide to control parasitic infestations on hatchery-reared fish. *J. Aquat. Anim. Heath*., 12:267-273.

RACH, J. J.; JAMES J.; VALENTINE, J. J.; SCHREIERA,T. M.; GAIKOWSKIA, M. P.; CRAWFORD, T. G. 2004. Efficacy of hydrogen peroxide to control saprolegniasis on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) eggs. *Aquaculture*, 238:135–142.

SITJÀ-BOBADILLA, A.; FELIPE, M. C.; ALVAREZ-PELLITERO, P. 2006. *In vivo* and *in vitro* treatments against *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Microcotylidae) parasitizing the gills of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 856–864.

TAVARES-DIAS, M.; LEMOS, J. R. G.; ANDRADE, S. M. S.; AQUINO-PEREIRA, S. L. 2006. Ocorrência de ectoparasitos em *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Characidae) cultivados em estação de piscicultura na Amazônia Central. CIVA. (http://www.civa2006.org), p. 726-731.

THOMAS-JINU, S.; GOODWIN, A. E. 2004. Acute columnaris infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinnesque): efficacy of practical treatments for warm water aquaculture ponds. *J. Fish Dis*., 27:23-28.

TORT, M. J.; WOOSTER, G. R.; BOWSER, P. R. 2003. Effects of hydrogen peroxide on hematology and blood chemistry parameters of walleye *Stizostedion vitreum*. *J. World Aquac. Soc*., 236-242.

TRIPI, C.; BOWSER, P. R. 2001. Toxicity of Hydrogen Peroxide to Pre-exposed Young-of-the-Year Walleye: Effects of Water Hardness and Age of Fish. *J. World Aqua. Soc*., 32:416-421.

VARELLA, A. M. B.; PEIRO, S. N.; MALTA, J. C. O. 2003. Monitoramento da parasitofauna de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Osteichthyes: Characidae) cultivo em tanques-rede em um lago de várzea na Amazônia, Brasil. In: URBINATI, E. C.; CYRINO, J. E. (Ed.). SIMBRAQ, Goiânia, 2002, AQUABIO: Jaboticabal, São Paulo, p. 95-105.

VERDOUW, H.; VAN ECHTED, C. J. A.; DEKKERS, E. M. J. 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium silicylate. *Water Res*., 12:397-402.

VOGEL, A. I. 1981. *Análise inorgânica quantitativa*. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara.

WEDEMEYER, G. A. 1996. *Physiology of fish in intensive culture systems*. Nova York: Chapman & Hall.

WINKALER, E. U. 2008. *Aspectos ecotóxicológicos dos inseticidas diflubenzuron e teflubenzuron para o pacu (Piaractus mesopotamicus)*. 79 f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, CAUNESP, Jaboticabal.

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 15

Efeitos da infestação por parasitos argulídeos na fisiologia e mecanismos de defesa inata em peixes cultivados

Fábio de Jesus Castro & Marisa Narciso Fernandes

Resumo
Os argulídeos são crustáceos ectoparasitos normalmente encontrados no tegumento de uma série de espécies de peixes, tanto cultivados quanto naqueles habitando o seu ambiente natural. Os principais gêneros pertencentes a este grupo são Argulus e Dolops e a diferença básica entre eles consiste em que Argulus possui apêndices anteriores modificados em ventosas para sua fixação ao hospedeiro, enquanto que em Dolops eles se modificaram em ganchos. Estes aparatos de fixação estão diretamente relacionados aos danos causados por estes parasitos aos seus hospedeiros. Assim, os efeitos dos argulídeos sobre seus peixes hospedeiros podem ser tanto diretos, quanto indiretos. Os efeitos diretos estão associados a lesões causadas no tegumento dos hospedeiros, com ruptura da integridade da epiderme e consequente instalação de infecção secundária por parte de micro-organismos oportunistas. Os efeitos indiretos estão relacionados ao estresse, uma vez que o parasito induz uma resposta ao estresse em seus hospedeiros. O estresse crônico imposto pelos parasitos pode levar a uma imunossupressão, o que torna os peixes mais susceptíveis às infecções por organismos patogênicos, já que seus mecanismos de defesa encontram-se debilitados. Assim, quando os sistemas de cultivo são infestados por grande número destes parasitos, as perdas normalmente estão ligadas a uma falência dos mecanismos mantenedores da homeostase iônica (desequilíbrio iônico), bem como pelo aumento da susceptibilidade às infecções secundárias. Por outro lado, quando em baixos níveis de infestação, algumas respostas induzidas pelos argulídeos podem ser consideradas compensatórias ou adaptativas aos hospedeiros. O aumento nos níveis plasmáticos de cortisol, por exemplo, pode restaurar a homeostase iônica perdida em função do estresse imposto pelo parasito. Além disso, a ativação dos mecanismos de

imunidade inata induzida pela infestação permite a sobrevivência dos hospedeiros ao estresse e outros danos causados pelos parasitos. A relação entre parasito e hospedeiro é extremamente complexa e muitos dos aspectos da interação entre os argulídeos e seus peixes hospedeiros devem ser ainda esclarecidos.

Abstract
Argulids are crustacean ectoparasites commonly found on the tegument of a series of reared fish species, or even in fish living in its natural environment. The mainly genera belonged to Argulidae family are Argulus and Dolops and the basic difference between them is the presence of maxillary suckers in Argulus and stylets in Dolops, both being attachment structures to the host. That attachment apparatus are directly related to damages caused by parasites to their hosts. Therefore, the effects of argulids on their fish hosts to be considered are direct and indirect effects. The direct effects are associated with lesions caused by parasites on the host tegument, followed by disruption of epidermis integrity and secondary infections installation. The indirect effects are related to stress, since the parasite can induce a stress response in the fish host. Chronic stress imposed by parasites can lead to an immunosuppression and fish become more susceptible to secondary infections, once defense mechanisms are debilitated. When culture systems are highly infested by these parasites, lost is normally associated with a failure in osmorregulatory mechanisms and increased susceptibility to secondary infections. On the other hand, in low argulids infestation levels some host responses can be considered compensatory or adaptive. The increase in plasma cortisol levels, for example, can restore the ionic homeostasis lost during the stress imposed by parasites. Besides, the activation of innate immune mechanisms induced by infestation can help fish to overcome the stress and other damages caused by parasites. The relationship between host and parasites are highly complex, and several aspects of the interaction between argulids and its hosts should be well understood.

Introdução

O parasitismo constitui o estilo de vida mais comum sobre a terra, uma vez que toda forma de vida pode estar permanente ou temporariamente envolvida nesta relação interespecífica (Thompson, 1994). Devido ao fato dos parasitos afetarem a vida de outros organismos, as interações coevolucionárias com seus hospedeiros são fatores determinantes na organização das comunidades e influenciam a diversidade de vida (Brandt et al., 2005). O parasitismo é também o maior fator limitante das populações naturais e pode, portanto, desempenhar um papel importante no equilíbrio dos ecossistemas (Hurtrez-Boussès et al., 2001).

Podemos definir o parasitismo como uma relação na qual um organismo, o hospedeiro, é prejudicado em certo grau pelas atividades do outro organismo, o parasito, que por sua vez, explora a fisiologia do hospedeiro para assegurar a sua sobrevivência. Necessariamente envolve a relação íntima entre duas espécies, e é esse contato íntimo e prolongado que

diferencia o parasitismo das atividades predatórias de muitos não-parasitos (Markell & Voge, 2003).

A relação parasito-hospedeiro é altamente complexa e provavelmente é o tipo de relação mais especializada, implicando numa forte interação genética entre o parasito e seus hospedeiros, o que leva a uma coadaptação entre as duas partes (Hurtrez-Boussès et al., 2001). Para a compreensão desta relação, é necessário se ter conhecimentos sobre as respostas do hospedeiro frente à infestação e fatores que possam interferir nestas respostas, como níveis de estresse, status geral de higidez, estádio de maturação gonadal, dentre outros (Tully & Nolan, 2002). Se as evidências de que os parasitos podem afetar a fisiologia dos seus hospedeiros são fortes (Tully & Nolan, 2002), há que se considerar também que estas respostas do hospedeiro possam afetar a biologia dos parasitos, envolvendo, por exemplo, a rejeição destes por parte dos hospedeiros (Shields & Goode, 1978; Woo & Shariff, 1990).

Wikel et al. (1994) definem uma relação parasito-hospedeiro bem sucedida como aquela em que há um balanço entre as limitações impostas pelo sistema de defesa do hospedeiro aos parasitos e a habilidade do parasito em modular, invadir ou restringir as respostas do hospedeiro. Esta premissa mostra claramente que as defesas do hospedeiro podem influenciar a estrutura populacional dos parasitos (Tully & Nolan, 2002).

Se considerarmos, portanto, que os peixes convivem em equilíbrio com parasitos e patógenos em seu ambiente natural, situações outras podem levar ao rompimento deste equilíbrio. Portanto, distúrbios de ordem ambiental, como alterações na qualidade da água e estresse, bastante comuns nos sistemas de cultivo intensivo de peixes, têm impactos negativos sobre os mecanismos de defesa dos peixes. Como consequência, os peixes tornam-se mais susceptíveis aos parasitos e patógenos, favorecendo o crescimento excessivo da população destes e o estabelecimento de doenças e parasitoses (Kubitza & Kubitza, 1999).

A susceptibilidade dos peixes aos parasitos e patógenos varia em função da espécie e de indivíduo para indivíduo. De forma geral: (1) é maior em peixes mais jovens (larvas e alevinos) quando comparado a peixes adultos; (2) é maior em peixes mal nutridos ou que passam por privação alimentar; (3) aumenta quando as condições na qualidade da água são inadequadas; (4) aumenta durante os períodos de primavera e outono, quando as temperaturas são mais amenas em algumas regiões; (5) aumenta com as sobrecargas fisiológicas impostas aos peixes, como exposição a substâncias tóxicas, demanda de energia para reprodução, entre outras (Kubitza & Kubitza, 1999).

Pouco se sabe com respeito à interação entre os chamados piolhos- de-peixes ou argulídeos e seus hospedeiros. Alguns estudos nesta área têm sido desenvolvidos. No entanto, Tully & Nolan (2002) enfatizam que os resultados obtidos de animais experimentalmente infestados nem sempre refletem a verdadeira natureza da relação parasito-hospedeiro. Muitas vezes tais estudos adotam um número excessivo de parasitos por peixe e os resultados podem refletir mais um quadro patológico do que uma situação em que a relação parasito-hospedeiro está em equilíbrio. Quando os níveis de parasitos por peixes são altos, aproximando-se àqueles que resultam em estados

patológicos, as respostas imunológicas dos hospedeiros podem estar reduzidas devido a fatores como estresse (Tully & Nolan, 2002).

Aspectos da biologia dos argulídeos e efeitos sobre seus hospedeiros

Durante o século XX, os crustáceos ectoparasitos de peixes não receberam o mesmo enfoque científico devotado a outros patógenos. Atualmente, no entanto, produtores e pesquisadores reconhecem as implicações destes parasitos sobre o sucesso econômico dos sistemas de cultivo de peixes (Walker et al., 2004). Há registros contínuos dos efeitos deletérios destes parasitos sobre seus hospedeiros em vários pontos do globo, tanto em pisciculturas (Bauer, 1959; Costello, 1993; Menezes et al., 1990) quanto em populações selvagens (Johnson et al., 1996; Poulin & FitzGerald, 1987, 1988).

Os argulídeos são crustáceos pertencentes à subclasse Branchiura, ordem Arguloidea, família Argulidae. Os principais gêneros pertencentes a esta família são *Argulus* e *Dolops*. Das 200 espécies de argulídeos descritas, 120 pertencem ao gênero *Argulus*, sendo este o mais amplamente difundido sobre o globo (Eiras, 1994; Walker et al., 2004). O gênero *Dolops* encontra-se restrito a América Central e do Sul, África e Oceania (Perez-Inigo, 1976). São considerados ectoparasitos obrigatórios, embora sejam encontrados com frequência nadando livremente na coluna d'água quando mudam de hospedeiro, na cópula, ou quando as fêmeas deixam seus hospedeiros para depositarem ovos. Em geral, apresentam baixa especificidade aos hospedeiros. Encontram-se aderidos à superfície corporal e, em alguns casos, na cavidade branquial e/ou brânquias de seus hospedeiros. Os indivíduos da espécie *Dolops carvalhoi*, por exemplo, são encontrados exclusivamente habitando a superfície de seus hospedeiros (Malta & Varella, 1983). O comprimento dos argulídeos varia entre 5 e 22 mm (Eiras, 1994).

O ciclo de vida dos argulídeos é direto. Os ovos são depositados sobre uma superfície apropriada (como plantas, pedras ou as paredes de vidro de um aquário), tipicamente em fileiras paralelas. O tempo de desenvolvimentos dos ovos é altamente dependente da temperatura da água, havendo um rápido desenvolvimento em altas temperaturas. Os ovos de *Argulus foliaceus*, por exemplo, eclodem após oito dias a 26°C ou após vários meses se os ovos forem depositados a temperaturas abaixo de 10°C (Walker et al., 2004). Após a eclosão, a forma larval já infestante assemelha-se bastante à forma adulta. Uma sucessão de mudas do exoesqueleto se dá a aproximadamente cada cinco dias, dependendo da espécie e da temperatura ambiente (Fryer, 1982). Os indivíduos deste grupo são dióicos e após cerca de 4-6 semanas é possível reconhecer-se um adulto maturo, muito embora este período seja generalizado, já que a maturação também é dependente da temperatura e da espécie de argulídeo. A cópula tipicamente ocorre sobre os hospedeiros. Todavia, foram observadas cópulas ocorrendo fora de seus hospedeiros, enquanto os parasitos nadavam livremente na coluna d'água. Os ovos são tipicamente cobertos por muco que, presumivelmente os protege de pequenos predadores ou micro-organismos oportunistas, ou ainda desempenhe um papel no equilíbrio hidromineral dos ovos fertilizados (Walker et al., 2004).

O aspecto morfológico de um argulídeo pode estar diretamente ligado ao seu estilo de vida ectoparasítico. O corpo achatado dorso-ventralmente, recoberto por uma carapaça arredondada, confere uma superfície hidrodinâmica que oferece pouca resistência às correntes de água que, se contrário, poderiam desalojar os parasitos enquanto os peixes se deslocam na coluna d'água. Apresentam exoesqueleto quitinoso e cromatóforos distribuídos pelo corpo (Walker et al., 2004). O corpo é dividido em três regiões distintas: encéfalo, tórax e abdômen (Figura 1). No tórax se encontram quatro pares de apêndices, os toracópodos, que são adaptados à natação. O abdômen é reduzido, indiviso e se apresenta na forma de dois lobos entre os quais existe um par de cercópodos diminutos (Perez-Inigo, 1976). No entanto, os mais intrigantes aspectos da morfologia dos argulídeos residem em sua região anterior ou encéfalo, uma vez que esta guarda a maior parte das estruturas relacionadas à adaptação à vida parasitária. Os apêndices anteriores dos argulídeos localizados na superfície ventral destes animais se modificaram em estruturas altamente especializadas à fixação e à alimentação sobre seus hospedeiros. No caso do gênero *Argulus*, o primeiro par de maxilas se modificou em ventosas tubulares, enquanto que em *Dolops* modificou-se em ganchos (Figura 2). Em adição a estas estruturas, as antenas e antênulas dos argulídeos também se modificaram em órgãos de fixação, apresentando-se na forma de ganchos. Espinhos e cerdas sobre a superfície ventral também corroboram a fixação aos hospedeiros. Mais uma vez, é na região anterior que se encontram os olhos compostos, que são bastante desenvolvidos, e os demais órgãos sensoriais, imprescindíveis à localização de seus hospedeiros (Perez-Inigo, 1976; Walker et al., 2004).

Figura 1. Espécime adulto do "piolho-de-peixe" *Dolops carvalhoi* Lemos de Castro, 1949.
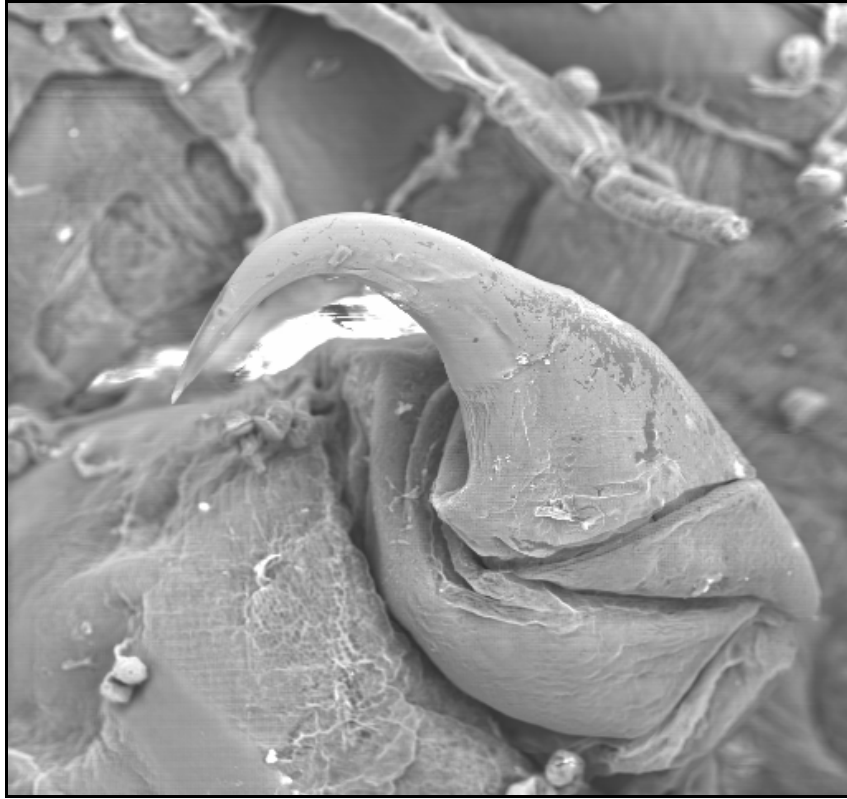
Figura 2. Micrografia eletrônica de varredura da região ventral de *D. carvalhoi*. Detalhe do gancho pontiagudo utilizado para a fixação ao hospedeiro, notar as articulações do gancho.

Conforme mencionado anteriormente, os argulídeos apresentam a capacidade de deixar seus hospedeiros e se locomoverem na coluna d'água. De fato, os argulídeos são exímios nadadores e a propulsão é provida pelos toracópodos (apêndices torácicos) que são cirriformes e birremes. Estes apêndices, no entanto, encontram-se em constante movimento para frente e para trás, mesmo estando os parasitos aderidos aos seus hospedeiros. É presumível que este movimento proporcione um fluxo de água através das superfícies respiratórias destes animais, auxiliando assim as trocas gasosas (Walker et al., 2004).

Os mecanismos empregados pelos argulídeos para se alimentarem de seus hospedeiros têm sido descritos por vários autores, todavia este tópico permanece em debate (Walker et al., 2004). De maneira simplificada, o aparato alimentar de um argulídeo é composto por um estilete pré-oral e uma probóscide ou tubo alimentar. Acredita-se que o estilete seja empregado como instrumento de inoculação de secreções tóxicas e/ou enzimas digestivas que atuariam na digestão de células epiteliais ou causando hemorragias subcutâneas. Assim, muito provavelmente os argulídeos se

alimentam dos sucos resultantes da digestão externa das células epiteliais e do sangue de seus hospedeiros (Shimura & Inoue, 1984; Walker et al., 2004). Mais recentemente Walker et al. (2003) encontraram evidências de que *Argulus japonicus* se alimenta de fato do sangue de seus hospedeiros.

A partir do conhecimento prévio dos mecanismos de fixação aos hospedeiros e alimentação dos argulídeos, podemos antever os efeitos que estes causam nos animais que os hospedam. Os efeitos dos parasitos argulídeos sobre seus peixes hospedeiros são bastante diversos e variam desde danos físicos causados pelas atividades de fixação e alimentação dos parasitos até mudanças comportamentais associadas ao estresse (Walker et al., 2004).

Mudanças comportamentais como esfregar-se contra substratos, saltar para fora dos tanques na tentativa de desalojar ou fugir do agente irritante, são comuns em peixes parasitados por argulídeos, o que demonstra serem estes incômodos aos hospedeiros. Perda de apetite, comportamento de agrupar-se ou separar-se dos indivíduos parasitados, letargia e mudanças no posicionamento vertical dos peixes na coluna d'água são outras mudanças comportamentais passíveis de ocorrerem (Walker et al., 2004).

Os argulídeos causam danos diretos no tegumento de seus hospedeiros devido aos seus mecanismos de fixação e alimentação. Estes danos podem ser resultantes tanto de ações mecânicas por parte do aparelho bucal, como das secreções químicas dos parasitos (Walker et al., 2004). No caso dos parasitos do gênero *Dolops*, os danos ao tegumento podem ser ainda mais pronunciados quando comparados ao gênero *Argulus*, uma vez que os ganchos pontiagudos empregados na fixação aos hospedeiros certamente perfuram o tegumento destes (Malta & Varella, 1983). Além disso, a capacidade de *Dolops* se locomover sobre seus hospedeiros pode facultar lesões e pontos hemorrágicos em várias partes do corpo do hospedeiro (Thatcher & Brites-Neto, 1994) (Figura 3). É necessário considerar também que os argulídeos adultos apresentam as estruturas de fixação bastante desenvolvidas e os danos aos hospedeiros neste estádio de desenvolvimento dos parasitos podem ser mais severos. De fato, segundo Walker et al. (2004), os danos aos hospedeiros são mais evidentes quando os argulídeos se encontram no estádio adulto.

Figura 3. Espécime jovem de pacu *Piaractus mesopotamicus* com alta infestação por *D. carvalhoi*. Notar a presença de vários pontos hemorrágicos sobre a superfície do hospedeiro.

A atividade mecânica dos argulídeos e a histofagia causam lesões no tegumento dos hospedeiros, que por sua vez, resultam em hemorragias. Consequentemente, a perda de sangue associada ao hábito hematófago dos parasitos podem levar a um quadro de anemia nos peixes parasitados (Thatcher & Brites-Neto, 1994). Lester & Roubal (1995) demonstraram que pequenas crateras podem ser formadas na pele dos hospedeiros, como resultado da atividade alimentar dos piolhos-de-peixe. Estas lesões podem levar ainda a um estresse osmótico no hospedeiro (desequilíbrio iônico por perda ou ganho de íons através das lesões) ou, em casos extremos, a uma total falência osmorregulatória, conforme demonstrado por Wootten et al. (1982) e Pike (1989) em salmão-do-atlântico *Salmo salar* infestado pelo parasito *Lepeophtheirus salmonis*. Outra consideração bastante oportuna é que as lesões expõem os hospedeiros à instalação de infecções secundárias por parte de micro-organismos oportunistas (Thatcher & Brites-Neto, 1994).

Além dos efeitos diretos dos argulídeos sobre seus hospedeiros, outro problema pode se somar e agravar ainda mais o quadro patológico

estabelecido – o estresse imposto pelos parasitos. É sabido que o estresse crônico causado pela infestação parasitária pode resultar em imunossupressão, aumentando a susceptibilidade dos hospedeiros a infecções secundárias (Pickering & Pottinger, 1989). Assim, os efeitos diretos (lesões no tegumento) e indiretos (estresse e imunossupressão) dos argulídeos sobre seus hospedeiros podem favorecer a instalação de infecções secundárias e comprometer o estado de higidez dos peixes. Em realidade, na grande maioria dos casos, são as infecções secundárias as principais causas de morte em peixes parasitados por argulídeos (Walker et al., 2004).

Respostas ao estresse em peixes e parasitismo

Na natureza e, em especial, nas condições de cultivo, o estresse em peixes é um fenômeno comum. O cultivo intensivo de peixes é um bom exemplo de uma prática em que as respostas ao estresse são de imediata importância econômica (Pickering, 1981).

Inúmeras definições para a palavra estresse podem ser encontradas na literatura científica. Assim, para nossos propósitos, podemos definir estresse como sendo uma condição em que o estado estacionário, ou homeostase, de um organismo animal é ameaçado ou perturbado como resultado das ações de estímulos intrínsecos e/ou extrínsecos, comumente definidos como estressores (Wendelaar Bonga, 1997).

Os agentes estressores podem ser tanto de natureza química, tais como os poluentes ambientais, quanto de natureza física, como o confinamento, a captura, a alta densidade populacional, o transporte, etc. Mudanças rápidas ou extremas no ambiente físico (como temperatura, O_2 dissolvido e salinidade), interações entre animais (predação, parasitas, competição intensiva por espaço, alimento ou parceiros sexuais) e interferência humana, incluindo as práticas comuns na piscicultura (transporte, confinamento e manipulação) e poluição da água (baixo pH, metais pesados e substâncias orgânicas), são exemplos de agentes capazes de provocar uma resposta ao estresse. Os agentes estressores, de modo geral, têm efeitos negativos sobre a conversão de alimento, crescimento, reprodução e sistema imune em peixes (Wendellar Bonga, 1997).

As respostas ao estresse em peixes são complexas e envolvem uma série de respostas fisiológicas e comportamentais consideradas compensatórias e/ou adaptativas, que tornam o animal capaz de superar os efeitos do estressor (Wendelaar Bonga, 1997). É convencional classificar as respostas ao estresse como primárias (respostas neurais e neuroendócrinas) e secundárias (as consequências fisiológicas das respostas primárias) (Mazeaud et al., 1977). Wedemeyer & McLeay (1981) consideram como respostas terciárias as mudanças no comportamento, o decréscimo na taxa de crescimento e o aumento de susceptibilidade às doenças nos animais em situação de estresse. McDonald & Milligan (1997) classificam ainda as respostas ao estresse como simples ou compostas. As respostas simples ao estresse envolvem todas as alterações fisiológicas provocadas pelos hormônios do estresse (catecolaminas e cortisol), enquanto que nas respostas compostas ao estresse, além das alterações fisiológicas mediadas por tais hormônios, somam-se as alterações consequentes de uma atividade física vigorosa, como por exemplo, diminuição acentuada no pH sanguíneo.

Estas respostas envolvem todos os níveis de organização de um animal e por isso são denominadas coletivamente de respostas integradas do estresse (Wendelaar Bonga, 1997).

As respostas primárias em peixes sob condições estressoras envolvem a ativação de altos centros cerebrais que, por sua vez, promovem a ativação de dois eixos neuroendócrinos: o eixo hipotálamo-simpático-células cromafins (eixo HSC), com as catecolaminas (CAs), epinefrina (ou adrenalina) e norepinefrina (ou noradrenalina) como produtos finais; e o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (eixo HHI), onde os corticosteroides, principalmente o cortisol, são liberados (Wendelaar Bonga, 1997). As ações destes hormônios em diversos órgãos ou células-alvo resultam nas denominadas respostas secundárias ou fisiológicas.

A primeira categoria de respostas neuroendócrinas ao estresse em peixes é a que envolve a ativação do eixo hipotálamo-simpático-células cromafins. Em peixes não existe um órgão definido como as medulas adrenais em mamíferos, mas sim células, denominadas células cromafins, espalhadas em diferentes órgãos, dependendo da espécie. Nos teleósteos, as células cromafins formam pequenas ilhas nas paredes das veias cardinais posteriores e, em algumas espécies, encontram-se dispersas nos rins cefálicos. Estas células desempenham funções equivalentes às das medulas adrenais em mamíferos. Assim, a biossíntese de CAs ocorre nas células cromafins dos peixes e a inativação dessas moléculas é feita no fígado e rins destes animais, antes de serem excretadas pela urina. A resposta adrenérgica em peixes é muito sensível ao estresse, o que resulta inevitavelmente em um aumento na concentração plasmática de CAs, variando de uma concentração de 5 nM (níveis basais) até uma concentração superior a 1.000 nM (Wendelaar Bonga, 1997). Independentemente da natureza do estímulo estressor, tanto a adrenalina como a noradrenalina podem ser dominantes, de acordo com a espécie em questão. A liberação de CAs é resultante da estimulação das células cromafins por fibras colinérgicas pré-ganglionares de nervos simpáticos, implicando na participação do sistema nervoso simpático na resposta adrenérgica (Mazeaud & Mazeaud, 1981). Desta forma, a resposta adrenérgica ao estresse ocorrerá imediatamente após o estímulo estressor ser aplicado. Embora a estimulação das células cromafins por acetilcolina pareça ser o mecanismo predominante para a secreção de CAs em teleósteos, outras substâncias têm sido identificadas como capazes de iniciar ou modular a secreção destes hormônios (Reid, 1999). Dentre estas substâncias estão a serotonina (Fritsche et al., 1993; Bernier & Perry, 1996), o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Reid et al., 1996), angiotensina II (Bernier & Perry, 1997) e as próprias CAs (Epple & Nibbio, 1985).

A ativação adrenérgica resulta em efeitos secundários principalmente sobre a circulação, respiração, osmorregulação e metabolismo dos peixes (Mazeaud & Mazeaud, 1981). Deste modo, as CAs circulantes aumentam a tomada de oxigênio, com consequente aumento na oxigenação dos tecidos, que é devida ao aumento da taxa de ventilação, do fluxo sanguíneo branquial, da capacidade de difusão do oxigênio, bem como da capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue, principalmente devido à ligação das CAs a receptores β-adrenérgicos (Randall & Perry, 1992). As CAs também estimulam a glicogenólise, o que resulta na liberação de glicose do fígado

para o sangue, levando assim a uma hiperglicemia no animal sob condições de estresse. Portanto, a concentração de glicose no plasma pode ser utilizada como parâmetro para se determinar níveis de estresse em peixes. Além disso, as CAs atuam indireta e negativamente sobre o balanço hidromineral, acarretando um aumento da permeabilidade das brânquias à água e aos íons, que é provavelmente devido ao aumento da pressão sanguínea nas lamelas secundárias e ao aumento do número de lamelas perfundidas (McDonald & Milligan 1997). Assim, no caso de peixes de água doce, pode ocorrer um influxo de água e um efluxo de íons para o meio, em animais que experimentam uma situação estressante.

A outra categoria de respostas neuroendócrinas ao estresse envolve a ativação de outro eixo neuroendócrino, o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (eixo HHI). Assim como em mamíferos, nos peixes a síntese e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela glândula hipófise está sob controle do hipotálamo. Este controle é feito através da síntese e liberação do fator liberador de corticotrofina (CRF) pelo hipotálamo (Donaldson, 1981). Segundo Donaldson (1981), mudanças nos meios externo e interno são detectadas pelos sistemas sensoriais dos peixes e estas mudanças, que podem ser interpretadas como agentes estressores, servem como estímulo para ativação do hipotálamo. Por sua vez, o hipotálamo libera CRF, que estimula as células corticotróficas da hipófise a produzirem e liberarem ACTH. Uma vez liberado na corrente sanguínea, o ACTH irá estimular a síntese e liberação dos corticosteroides pela interrenal, que corresponde ao córtex adrenal dos mamíferos.

A interrenal dos teleósteos encontra-se geralmente na porção anterior dos rins ou rins cefálicos, em associação com as veias pós-cardinais, porém, algumas variações deste modelo podem ocorrer, dependendo da espécie (Nandi, 1962). A atividade da interrenal é aumentada quando o peixe se encontra exposto aos vários tipos de estressores, devido ao aumento na síntese e liberação de ACTH. Segundo Wendelaar Bonga (1997), a síntese e liberação de corticosteroides, além de ACTH, são mediadas também pelo hormônio α-melanócito estimulante (αMSH) e, possivelmente, por β-endorfina, que também são derivados da POMC (proópiomelanocortina). Outros fatores que também apresentam ação corticotrófica são o fator atrial natriurético, angiotensina II, hormônio de crescimento (GH), tiroxina, arginina vasotocina e CAs, embora seja provável que estes fatores estejam mais propriamente relacionados à modulação do que à secreção de corticosteroides pela interrenal (Wendelaar Bonga, 1997). Os corticosteroides encontrados em maiores concentrações no plasma de teleósteos são o cortisol e a cortisona, sendo que o primeiro é secretado em maior quantidade pela interrenal do que o segundo (Donaldson, 1981). Em salmonídeos, o nível basal de cortisol em peixes que se encontram em condições de repouso (não estressoras) é abaixo de 10 ng/ml (Gamperl et al., 1994; Wendelaar Bonga, 1997). Nolan et al. (2000a), por exemplo, verificaram uma elevação na concentração plasmática de cortisol de 10 para 65 ng/mL em trutas arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, aclimatadas em laboratório e expostas durante três horas à água poluída do rio Reno.

Assim como em mamíferos, o cortisol em peixes atua via feedback negativo como inibidor da síntese e liberação de CRF pelo hipotálamo

(feedback de alça longa) e ACTH pela hipófise (feedback de alça curta) (Donaldson, 1981).

O cortisol tem um amplo espectro de atividade em peixes. As duas principais funções são mineralocorticóide e glicocorticoide, que envolvem dois tipos de receptores intracelulares, os chamados receptores mineralocorticoide e glicocorticoide, respectivamente (Wendelaar Bonga, 1997). Em sua função glicocorticoide, o cortisol estimula a glicogenólise no fígado, ocasionando uma hiperglicemia, além de estimular também a gliconeogênese neste mesmo órgão, como por exemplo, a síntese de glicose a partir de substratos não protéicos, tais como o aminoácido alanina e lactato (Vijayan et al., 1994a, b). Quanto à sua função mineralocorticoide, o cortisol atua na regulação osmótica e iônica, sendo capaz de estimular a diferenciação de células cloreto nas brânquias e o aumento da atividade específica das enzimas relacionadas ao transporte de íons, em particular a enzima sódio-potássio adenosinatrifosfatase (Na^+/K^+-ATPase) (Wendelaar Bonga, 1997).

As células cloreto presentes no epitélio branquial são a chave para os processos osmorregulatórios em teleósteos (Evans, 1993). Estas células são caracterizadas por apresentarem grande número de mitocôndrias e alta concentração de Na^+/K^+-ATPase no sistema tubular contínuo com a membrana basolateral destas células (McCormick, 1995). Em teleósteos de água doce, as células cloreto estão envolvidas na tomada de íons do meio, já que estes animais vivem em ambiente hiposmótico em relação ao seu meio interno e enfrentam o problema constante da perda de íons para o ambiente (Zadunaisky, 1984). McCormick (1995) demonstrou que o tratamento com cortisol estimula a atividade da Na^+/K^+-ATPase e a diferenciação de células cloreto nas brânquias de várias espécies de teleósteos. Laurent & Perry (1990) também demonstraram o aumento no número de células cloreto nas brânquias de truta, *Oncorhynchus mykiss*, tratadas com injeção intramuscular de cortisol, bem como o aumento na área de superfície apical de cada célula cloreto individual. Perry et al. (1992) correlacionaram o influxo de íons Na^+ e K^+ ao número e, principalmente à área fracional das células cloreto (CCFA), sendo maior o influxo destes íons em espécies que possuem maior CCFA. Consequentemente, o cortisol aumenta a capacidade de transporte de íons pelas brânquias, devido à ativação das bombas iônicas e ao aumento do número e da superfície apical de células cloreto nestes órgãos (Flik & Perry, 1989; Perry & Laurent, 1993).

Conforme já mencionado, o aumento no nível de CAs circulantes liberadas durante o estresse aumenta a permeabilidade do epitélio branquial à água e aos íons, causando perturbações no equilíbrio hidromineral em peixes (Randall & Perry, 1992) e segundo Wendelaar Bonga (1997), o cortisol como principal corticosteroide sintetizado em teleósteos e em sua função mineralocorticóide é essencial para a restauração da homeostase hidromineral perdida em função das ações das CAs.

Dentre os agentes estressores encontrados na natureza ou nos sistemas de cultivo de peixes, os parasitos podem ser também considerados como estressores aos seus hospedeiros. Alguns estudos prévios têm explorado a hipótese de que infestações com piolhos-de-peixes são capazes de desencadear uma resposta ao estresse nos peixes infestados (Grimnes & Jakobsen, 1996; Nolan et al., 1999; Bowers et al., 2000; Poole et al., 2000; Ruane et al., 2000). No entanto, poucos estudos têm investigado o papel dos

parasitos nas respostas ao estresse frente a outros estressores (Haond et al., 2003).

Muitos dos autores usaram experimentos de desafio para examinar as respostas ao estresse de peixes infestados com ectoparasitos e estes estudos incluem diferentes espécies e tamanhos de peixes. O que é claramente evidente em muitos destes estudos é que o nível de estresse causado pelos ectoparasitos é influenciado pela intensidade de infestação, tamanho e condição dos hospedeiros e, possivelmente, espécie de hospedeiro em questão (Walker et al., 2004).

Infestações com um pequeno número de ectoparasitos, também conhecidos como piolho-de-peixe de salmões, *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda), não resultaram em um significante aumento nos níveis de cortisol plasmático nos hospedeiros (Bjorn & Finstad, 1997; Johnson & Albright, 1992). No entanto, altos níveis de infestação podem causar substancial elevação, acima daquelas consideradas capazes de causar uma imunossupressão (Johnson & Albright, 1992; Mustafa et al., 2000). Por outro lado, Nolan et al. (1999) observaram mudanças no balanço iônico e aumento na atividade da enzima Na^+/K^+-ATPase nas brânquias de salmões infestados por um baixo número de parasitos daquela referida espécie.

Com relação aos parasitos argulídeos, Nolan et al. (2000b), por exemplo, notaram que um baixo número de *Argulus foliaceus* (seis parasitos por peixe) não foi capaz de elevar significativamente os níveis plasmáticos de cortisol em *O. mykiss*, 48 horas após o início da infestação. Eles atribuíram esta resposta ao fato de que os ectoparasitos coevoluíram com seus organismos hospedeiros e, portanto, os últimos provavelmente desenvolveram uma tolerância a baixo número de piolhos. No entanto, Ruane et al. (1999) encontraram elevados níveis de cortisol em trutas arco-íris *O. mykiss* infestadas com *A. foliaceus*, 48 horas após 4 horas de estresse de confinamento. Isto sugere que, enquanto os efeitos dos argulídeos podem não ser notados imediatamente após a infestação, os efeitos se tornam mais aparentes quando a resposta a um segundo estressor é examinada.

Em consonância com os estudos acima citados, podemos concluir que certas espécies de peixes podem tolerar baixos números de ectoparasitos, se estressores adicionais não estiverem presentes. Os efeitos do estresse têm implicações em outros sistemas do hospedeiro, incluindo as respostas imunológicas. É sabido que peixes parasitados por ectoparasitos estão frequentemente sujeitos às infecções secundárias, possivelmente devido à imunossupressão mediada pelas respostas ao estresse (Walker et al., 2004). Ectoparasitos também podem induzir respostas no tegumento dos peixes similares àquelas induzidas por estressores tóxicos (Tully & Nolan, 2002).

Sistema imune não-adaptativo e a epiderme dos peixes

É comum dividir-se o sistema imune em não-adaptativo (inato ou não-específico) e adaptativo (adquirido ou específico). No entanto, há fortes evidências, tanto pela imunologia dos mamíferos quanto dos peixes, de que estes dois sistemas sejam cooperantes. A resposta inata geralmente precede a adaptativa, ativa e determina a natureza desta última e coopera na manutenção da homeostase (Magnadóttir, 2006). Por isso, nos últimos 15 anos, muitos imunologistas têm mudado seus enfoques de estudo da

imunidade adquirida para a inata, fato este que reflete a crescente consciência da importância das respostas imune não-adaptativas na manutenção da saúde humana e de outros animais (Menezes & Jared, 2002).

A imunidade específica é mais especializada do que a imunidade inata e suplementa a proteção provida pela última. A imunidade adquirida aparece relativamente tarde em termos evolutivos nos cenários do reino Animalia e encontra-se presente tão somente nos vertebrados (a partir dos vertebrados mandibulados) (Benjamini et al., 1996). Em termos gerais, ela é caracterizada por alguns aspectos que a distinguem de outros sistemas fisiológicos: (1) **especificidade**: a habilidade do sistema em distinguir as diferentes entidades moleculares presentes e responder apenas àquelas requeridas; (2) **adaptação**: a capacidade de responder a moléculas previamente não presentes; (3) **distinção entre "próprio" e "não-próprio"**: a habilidade de reconhecer e responder a moléculas que são estranhas ("não-próprias") e evitar a resposta a moléculas que são "próprias"; (4) **memória**: a habilidade de responder a moléculas estranhas previamente contatadas e de maneira mais rápida e exacerbada. Para desempenhar suas funções, a imunidade adaptativa conta com duas linhas de defesa: a *imunidade humoral*, representada pela síntese de anticorpos circulantes pelos linfócitos B ativados ou plasmócitos e a *imunidade celular*, representada por células (linfócitos T) que interagem fisicamente e destroem células "não-próprias", tumorais ou infectadas por micro-organismos (Melingen, 2001).

A imunidade não-adaptativa ou inata pode ser definida como o conjunto de mecanismos de resistência ou primeira linha de defesa do hospedeiro, empregado para controlar infecções imediatamente após a exposição do hospedeiro aos antígenos. É atualmente aceito que estes mecanismos inatos estejam diretamente ligados à imunidade adaptativa ou adquirida em mamíferos (Medzhitov & Janeway, 1999; Gommerman & Carroll, 2000). Estes componentes não-específicos, todavia efetivos, de primeira linha de defesa, não apenas atenuam o impacto das infecções causadas por micro-organismos invasores, como também estimulam as respostas específicas da imunidade adquirida presente em todos os vertebrados (Menezes & Jared, 2002). A ativação dos componentes do sistema inato (como a estimulação de fagócitos, produção de citocinas e quimocinas, ativação do sistema complemento e vários outros receptores celulares) estimula, por sua vez, as células B, T e apresentadoras de antígeno do sistema imune adaptativo (Magnadóttir, 2006).

Semelhantemente aos invertebrados, o sistema imune inato dos peixes é de primordial importância no combate às infecções, uma vez que a resposta imune adquirida dos peixes é ineficiente, fato este devido ao seu status evolutivo e sua natureza ectotérmica. Isto resulta em um limitado repertório de anticorpos, afinidade e memória e uma lenta proliferação de linfócitos. A resposta imune adquirida dos peixes é, todavia, morosa (até 12 semanas) quando comparada à resposta imune inata, a qual é instantânea e relativamente independente da temperatura. Além disso, vários exemplos mostram que parâmetros do sistema imune inato dos peixes são mais ativos e mais diversos quando comparados aos de mamíferos, como por exemplo, uma maior diversidade de certos componentes do sistema complemento e alta atividade espontânea da rota alternativa (Magnadóttir, 2006).

O sistema imune inato, assim como o adaptativo, é também capaz de reconhecer e distinguir o “próprio” do “não-próprio”, embora o faça por meio de mecanismos diferentes daqueles empregados pelo sistema adaptativo. O sistema de reconhecimento do “não-próprio” do sistema imune inato é mediado por um padrão de reconhecimento proteínas/receptores que identifica padrões moleculares característicos dos patógenos (moléculas “não-próprias”, como peptidoglicanos e lipopolissacarídeos (LPS) das paredes celulares de bactérias, β1,3-glucan de fungos, RNA viral e DNA bacteriano) e padrões moleculares intracelulares expostos através de danos nos próprios tecidos dos hospedeiros (moléculas “próprias”, como DNA, RNA, “heat chock proteins” e outras chaperoninas e oligomanoses de glicoproteínas pré-secretadas) devidos a infecções, necrose e morte celular natural, sinalizando perigo ao sistema imune (Magnadóttir, 2006).

A maioria dos componentes do sistema imune inato dos peixes é o mesmo encontrado nos invertebrados e nos vertebrados superiores e está dividido em parâmetros físicos, celulares e fatores humorais (Magnadóttir, 2006).

Os parâmetros físicos incluem as escamas dos peixes, a superfície mucosa das brânquias e pele e a epiderme, que atuam como as primeiras barreiras contra infecções. O importante papel de defesa do muco é bem conhecido e tem sido estudado em várias espécies de peixes. O muco dos peixes contém parâmetros imunes como lecitinas, pentraxinas, lisozimas, proteínas do complemento, peptídeos antimicrobianos e IgM (Magnadóttir, 2006). Variações na resistência a doenças entre diferentes espécies de peixes podem estar associadas, pelo menos em parte, a diferenças genéticas dos elementos protetores do muco. Isto pode ser demonstrado por semelhante susceptibilidade de, por exemplo, salmonídeos à injeção de um patógeno em particular, mas diferente susceptibilidade a um desafio de imersão (Secombes & Olivier, 1997).

As principais células do sistema imune inato compreendem as células fagocitárias (granulócitos e macrófagos/monócitos) e as chamadas células citotóxicas não-específicas. Porém, as células epiteliais e dendríticas também participam na frente de defesa inata dos peixes (Magnadóttir, 2006). O papel dos macrófagos e da epiderme e seus componentes celulares são discutidos detalhadamente mais adiante.

Dentre os chamados parâmetros humorais do sistema imune inato, destacam-se (Magnadóttir, 2006):

- Transferrina - ativa os macrófagos e quela o ferro que é essencial para o metabolismo bacteriano;
- Interferon – inibe o crescimento bacteriano e induz a expressão de proteínas antivirais;
- Inibidores de proteases - como a α2-macroglobulina, que inibe a ação de proteases nos fluidos corpóreos, com função de manter a homeostase;
- Enzimas líticas - como lisozimas (ação lítica de bactérias gram-positivas e negativas, opsonização e ativação do sistema complemento e fagócitos) e quitinases (defesa contra bactérias e fungos, porém sua existência em peixes ainda não foi provada);
- Aglutininas e precipitinas (encontradas no plasma e muco) - como lecitina do tipo C (interage com carboidratos, o que leva a opsonização,

fagocitose e ativação do sistema complemento) e pentraxina (se liga também a carboidratos da parede bacteriana, ativa as vias do complemento e desempenha um papel no reconhecimento e eliminação de células apoptóticas);

- Anticorpos naturais - produzidos na ausência de um estímulo antigênico pelos linfócitos B de mamíferos e apresentam baixa afinidade, podendo se ligar a antígenos próprios e não próprios. As funções dos anticorpos naturais são: eliminação de células apoptóticas sem desencadear uma resposta imune, defesa contra tumores, isolamento e direcionamento de patógenos para os centros germinais ativos;
- Citocinas e quimiocinas - compõem uma rede de moléculas sinalizadoras que controlam e coordenam as respostas inatas e adquiridas;
- Peptídeos antibacterianos: presentes no muco e no soro de peixes.

A fagocitose é um mecanismo de defesa primordial em todos os organismos metazoários. Consiste em uma forma de endocitose, onde grandes partículas são ingeridas por vesículas endocíticas, chamadas fagossomos. O processo fagocítico pode ser iniciado por endocitose mediada por receptores ou através de interações hidrofóbicas da membrana celular com a partícula-alvo. As células imunes dos vertebrados capazes de realizar fagocitose em variados graus são as células B, macrófagos, fibroblastos e granulócitos (neutrófilos e eosinófilos) (Neumann et al., 2001). Embora o tema seja ainda controverso, alguns autores também consideram os trombócitos como células fagocíticas e atuantes no processo inflamatório dos peixes (Stosik et al., 2001; Meseguer, et al., 2002; Stosik et al., 2002).

O papel fundamental das células fagocíticas na defesa dos hospedeiros consiste em limitar a disseminação inicial e/ou o crescimento dos agentes infecciosos. Uma vez contidos, outras células imunes são recrutadas para ajudar a destruir os organismos invasores. As células fagocíticas como macrófagos e neutrófilos possuem um repertório de potentes moléculas antimicrobianas pré-sintetizadas e estocadas em lisossomos. Estas organelas contêm uma série de enzimas degradantes (como proteases, nucleases, fosfatases, esterases e lípases) e peptídeos antimicrobianos (como peptídeos neutrofílicos e proteínas básicas) que são liberados no interior do fagolisossomo, quando da ingestão de organismos estranhos, e destroem ativamente as partículas fagocitadas (Neumann et al., 2001).

O tipo celular mais comumente associado a uma grande capacidade fagocítica é o macrófago. Embora o termo “macrófago” seja comumente usado para representar um grupo específico de células imunológicas, os macrófagos na realidade constituem-se em uma população celular extremamente heterogênea. Subpopulações diferentes de macrófagos podem apresentar características citoquímicas, funções celulares, expressão de marcadores de superfície e/ou localização tecidual únicas. No entanto, a ampla distribuição dos macrófagos no corpo dos vertebrados assegura a contínua proteção dos tecidos do hospedeiro contra invasores, uma vez que estes são rapidamente fagocitados e destruídos (Neumann et al., 2001).

Diferentemente dos macrófagos, os neutrófilos representam uma classe de leucócitos que parecem ser ativados por estímulos imunológicos

específicos. Estas células são rapidamente recrutadas da circulação e dos sítios hematopoiéticos de estocagem para os locais de inflamação. Os neutrófilos são "células suicidas" que fagocitam ativamente partículas estranhas e liberam enzimas degradantes, moléculas antimicrobianas e metabólitos tóxicos no sítio de inflamação. Estas células contêm e destroem qualquer patógeno em potencial nos sítios inflamatórios e recrutam outras células imunes para os focos de infecção. Através de sua alta atividade migratória, os neutrófilos dos peixes são os primeiros a chegar aos sítios de infecção com o intuito de prevenir a difusão dos agentes infecciosos. Consequentemente, uma segunda fase de migração de neutrófilos ocorre, em que células com uma maior capacidade de destruir os patógenos migram para a área infectada. Esta onda de migração de neutrófilos é subsequentemente seguida por um recrutamento de monócitos em muitas espécies de peixes (Neumann et al., 2001).

Macrófagos e neutrófilos possuem um repertório de mecanismos antimicrobianos que são extremamente eficientes em destruir patógenos invasores. Um macrófago pode ser transformado de uma célula normalmente inativa para uma célula com alta capacidade de destruição, processo este referido como *ativação do macrófago*. Este conjunto de reações dependentes de citocinas induz os macrófagos a sintetizarem uma série de moléculas altamente tóxicas. Da mesma maneira, a capacidade fagocítica dos neutrófilos pode ser grandemente aumentada em resposta a estímulos por citocinas. Portanto, a atividade destes fagócitos está sob o controle dos mediadores químicos do sistema imune, as chamadas citocinas (Neumann et al., 2001).

O tegumento dos animais consiste em uma barreira protetora externa que separa o animal do seu ambiente. O tegumento dos peixes é análogo ao dos mamíferos terrestres e é normalmente composto por uma epiderme e derme, sustentadas por uma hipoderme ou camada subcutânea (Le Guellec et al., 2004). No entanto, há que se considerar uma diferença fundamental entre o tegumento de vertebrados que ocupam ambientes tão distintos - o tegumento dos vertebrados terrestres apresenta uma epiderme contendo células mortas e queratinizada nas camadas superficiais, enquanto que a epiderme dos peixes é mucogênica e compõe-se por tão somente células vivas. Evidentemente, estas características nada mais são que adaptações ao ambiente aéreo-terrestre e aquático, respectivamente (Henrikson & Matoltsy, 1968). Devido a sua complexidade, funcionalidade e interação com o ambiente externo, a epiderme dos peixes tem recebido uma maior atenção por parte dos pesquisadores, comparativamente aos estudos sobre a derme (Le Guellec et al., 2004).

A epiderme dos peixes constitui-se em um complexo epitélio composto por várias camadas de células vivas em continuidade sobre a superfície corporal dos animais (Iger & Wendelaar Bonga, 1994). Ela forma a primeira barreira entre o meio externo e interno do animal e é protegida por uma cobertura de muco química e funcionalmente complexa, a qual é descarregada por células mucosas especializadas presentes na epiderme (Shephard, 1994). A epiderme dos teleósteos é ainda influenciada por uma série de fatores endócrinos e mostra mudanças características em peixes expostos a agentes estressores (Iger et al., 1995; Wendelaar Bonga, 1997).

É comum subdividir-se a epiderme dos peixes em três regiões com composição celular e funcional distintas. O estrato celular superficial é composto por uma única camada de células geralmente pavimentosas, cuja superfície exterior é ornamentada com microcriptas. Estas ornamentações provavelmente auxiliam na retenção das mucosubstâncias secretadas para a superfície do tegumento. As células da camada superficial da epiderme possuem também um rico conteúdo em microfilamentos (muito provavelmente filamentos de queratina), o que assegura uma proteção ao animal contra choques osmóticos e mecânicos. Esta camada celular exterior não é renovada periodicamente, mas cada célula é individualmente reposta quando morta. Diferentemente do estrato superior, várias camadas celulares constituem o estrato intermediário da epiderme, composto pelas chamadas células epiteliais filamentosas (também ricas em microfilamentos) e vários outros tipos de células especializadas: as células mucosas (também chamadas células “goblet”), células “club” (supostamente responsáveis pela síntese de substâncias de alarme) e as células sensoriais. Muitas das células desta região permanecem, no entanto, indiferenciadas. Elas servem como um reservatório para a reposição de células mortas em cada uma das regiões da epiderme e podem se dividir rapidamente quando necessário. A terceira e mais profunda região da epiderme dos peixes (também chamada de camada ou estrato basal), é composta por única camada celular, cuja principal função é manter a epiderme ancorada à derme subjacente. Isto é feito com o auxílio de estruturas de adesão, como hemidesmosomos, que se aderem à membrana basal que, por sua vez, separa a epiderme da derme. Esta organização da epiderme em três estratos é invariavelmente a mesma em todas as espécies de peixes teleósteos. Variações na espessura e composição celular da epiderme concernem tão somente à região intermediária e estão relacionadas às adaptações ecológicas das espécies. Em adição, a epiderme dos peixes é penetrada por fibras nervosas. Elas podem ser terminações nervosas livres ou estarem associadas a células epidérmicas sensoriais (Le Guellec et al., 2004).

Além das células já citadas, a epiderme de alguns teleósteos pode apresentar ainda outros tipos celulares como células cloreto, cromatóforos (normalmente encontrados na derme), células “merkel” e “rodlet” (Iger et al., 1994). A epiderme dos peixes pode ainda abrigar uma população de linfócitos infiltrantes, em situações normais e mais insidiosamente durante o processo inflamatório. Assim, leucócitos como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos são normalmente encontrados infiltrados na epiderme dos peixes. Essa característica reforça a concepção da epiderme como importante órgão de defesa primária nos peixes (Buchmann, 1999).

As células epiteliais do estrato superior da epiderme parecem desempenhar um papel importante como integrantes nas defesas primárias dos peixes. Elas apresentam inúmeras vesículas de secreção, que contêm atividade de peroxidase endógena (Iger et al., 1995). O conteúdo destas vesículas é secretado para o glicocálix e muco dos peixes, onde as peroxidases atuam como antimicrobicidas (Haond et al., 2003). Haond et al. (2003) demonstraram que a estimulação da síntese de vesículas na epiderme da truta arco-íris *O. mykiss* pela administração de cortisol está associada à redução do estabelecimento do ectoparasito *A. japonicus* em seus hospedeiros.

Por outro lado, as células epiteliais epidérmicas dos peixes são capazes de produzir interleucina do tipo 1 (IL-1) e a síntese desta citocina é aumentada na epiderme de peixes após infestação com ectoparasitos (Sigel et al., 1986; Buchmann & Bresciani, 1998). Esta citocina possui uma série de efeitos sobre outras células epidérmicas. Em peixes, a IL-1 induz hiperplasia, ativação de macrófagos, potencia a resposta de linfócitos e induz a secreção de muco pelas células mucosas (Buchmann, 1999).

O muco que recobre a superfície da epiderme é considerado como a primeira linha de defesa contra patógenos invasores. Ele apresenta em sua composição uma série de substâncias biologicamente ativas, como imunoglobulinas, fatores do complemento, peptídeos, lisozimas e proteases, vários tipos de carboidratos e lecitinas. Assim sendo, a presença de uma considerável população de células mucosas na epiderme dos peixes prontamente sugere que este tipo celular possa estar envolvido não apenas na defesa contra micro-organismos patogênicos, como também na imunidade a infestações por ectoparasitos. Esta hipótese deriva do fato de que o muco e as células mucosas dos mamíferos participam das respostas do hospedeiro contra nematóides intestinais. A liberação do conteúdo das células mucosas induzida pela produção de IL-1 pelas células epiteliais lesadas por ectoparasitos pode então afetar o estabelecimento destes em seus hospedeiros (Buchmann, 1999).

Danos ou invasão por parasitos na epiderme dos peixes são seguidas por desenvolvimento de reações inflamatórias com a infiltração de vários tipos celulares, incluindo neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e basófilos. Nesta ocasião, a ativação de leucócitos induz a produção de leucotrienos, como LTB4, uma substância conhecida por estimular a migração de neutrófilos e eosinófilos dos peixes para os pontos de inflamação. Tanto os macrófagos como os neutrófilos dos peixes são capazes de secretar IL-1, que mais uma vez irá afetar outros macrófagos e linfócitos dos peixes. Uma outra citocina, o fator de necrose tumoral (TNF), é também produzido pelas células durante a reação inflamatória. É possível que TNF participe juntamente com IL-1 no aumento da produção de muco pelas células mucosas. Todas estas citocinas afetam os diferentes leucócitos infiltrantes da epiderme, que provavelmente têm importantes funções nas reações aos ectoparasitos (Buchmann, 1999). Hardie et al. (1994) demonstraram que TNF em interação com o fator ativador de macrófago (MAF) afetam positivamente a atividade oxidativa dos macrófagos. Tais eventos são altamente antiparasíticos *in vitro* e não se pode excluir a hipótese de que os metabólitos de oxigênio reativos liberados nestes processos, assim como os fatores do complemento sintetizados pelos macrófagos possam afetar os ectoparasitos (Buchmann, 1999).

Outro tipo celular comumente encontrado infiltrando a epiderme dos peixes são os linfócitos. Em geral, uma infiltração de linfócitos B é pequena nas reações inflamatórias a ectoparasitos na pele de mamíferos. No entanto, linfócitos T são importantes fatores envolvidos nas reações a estas infestações e geralmente desempenham um papel importante na imunidade da pele. Em peixes, é completamente aceito atualmente a existência de equivalentes celulares a células B e T. Todavia, o papel dos linfócitos nas respostas dos peixes a ectoparasitos é ainda incerto (Buchmann, 1999). Graves et al. (1985) sugeriram que células citotóxicas não-específicas

(linfócitos T) sejam responsáveis pela resposta protetora dos peixes a ciliados invasores da pele. Há também a sugestão de que linfócitos B infiltrantes na epiderme possam sintetizar e liberar imunoglobulinas para o muco. Estes anticorpos, por sua vez, poderiam se ligar a moléculas no intestino de parasitos ou outras estruturas internas, afetando assim os ectoparasitos invasores (Buchmann, 1999).

Em resumo, todas estas evidências apontam para um modelo hipotético onde a ativação (mecânica e/ou química) da epiderme dos peixes por ectoparasitos leva a uma cascata de reações em células constituintes ou infiltrantes do epitélio. Estas respostas podem culminar na eliminação dos ectoparasitos, seja através da morte ou fuga para superfícies menos hostis (como peixes não infestados, paredes ou fundo dos tanques ou regiões menos reativas dos hospedeiros) (Buchmann, 1999).

Alguns parâmetros do sistema imune inato, como fagocitose, níveis de lisozima, atividade hemolítica espontânea e, em alguns casos pentraxinas, têm sido utilizados como indicadores dos efeitos de fatores internos e externos sobre o sistema imune e a resistência a doenças em peixes. Características genéticas, fatores sazonais, temperatura ambiental, poluição, estresse de manuseio e confinamento, dietas e aditivos alimentares, imunoestimulantes e probióticos, bem como os efeitos de doenças e vacinação, são fatores considerados capazes de influenciar o sistema imune inato e a imunocompetência dos peixes.

De modo geral, a baixa temperatura parece afetar mais as respostas imunoespecíficas dos peixes (diminui a atividade e a produção de anticorpos) do que as respostas imunes inatas. Alguns peixes não apresentam mudanças nos parâmetros imunes inatos, como o atum, enquanto outros, como a truta, apresentam. Os efeitos imunossupressivos da poluição e estresse, resultando numa maior susceptibilidade a doenças, são bem conhecidos. No entanto, a escolha de um componente do sistema imune não-adaptativo que poderia atuar como biomarcador para condições adversas em aquicultura é um tanto quanto problemática. Isto por causa dos efeitos variados sobre os parâmetros inatos, dependendo do tipo e duração da condição adversa, bem como da espécie de peixe. Aditivos alimentares como vitaminas, lipídios ou alta composição de carboidratos podem ou não estimular parâmetros do sistema imune não-adaptativo, todavia continuam sendo benéficos ao crescimento e sobrevivência dos peixes. Há também um crescente interesse no uso de imunoestimulantes como agentes estimulantes do sistema imune não-adaptativo e adaptativo. São exemplos de imunoestimulantes o β-1,3-glucan, LPS, quitosana e a lactoferrina. A rápida resposta do sistema imune não-adaptativo aos imunoestimulantes pode beneficiar peixes sob condições extremas nos sistemas de aquicultura (Magnadóttir, 2006).

Respostas fisiológicas, morfológicas e imunológicas de pacu *P. mesopotamicus* frente à infestação experimental com *D. carvalhoi*

Há poucos trabalhos, até o presente, abordando aspectos da interação entre peixes nativos e parasitos argulídeos (Tavares-Dias et al., 1999; Schalch et al., 2005; Castro, 2006). Temas como respostas fisiológicas ao estresse e do sistema imune do hospedeiro à infestação foram explorados por

Castro (2006) em pacus *P. mesopotamicus*, experimentalmente infestados pelo argulídeo *D. carvalhoi*.

Neste estudo, exemplares do parasito *D. carvalhoi* foram coletados em piscicultura e cultivados em laboratório para a execução dos protocolos experimentais. Um estudo de tal natureza possibilita avaliar, sob condições controladas de laboratório, as respostas dos hospedeiros à infestação, além de permitir o controle dos níveis de infestação (número de parasitos por peixe).

Para tal propósito, as respostas fisiológicas e morfológicas e a participação do sistema imune não-adaptativo de pacus juvenis experimentalmente infestados com *D. carvalhoi* foram analisadas. Três protocolos experimentais diferentes foram desenhados com o intuito de se investigar (1) os efeitos dos parasitos sobre seus hospedeiros, (2) as respostas dos hospedeiros que possam interferir no estabelecimento dos parasitos e (3) a influência da exposição crônica dos hospedeiros às formas jovens de *D. carvalhoi* sobre as respostas ao estresse agudo de confinamento.

Os resultados deste estudo mostraram que mesmo baixos níveis de infestação, com apenas de três e seis parasitos adultos por peixe, foram capazes de induzir uma clara resposta ao estresse nos hospedeiros. Em cinco dias após o início da infestação, por exemplo, foi verificado um aumento nos valores de hematócrito, hiperglicemia e aumento nos níveis de cortisol plasmático, que são respostas fisiológicas típicas ao estresse. Nenhuma alteração foi verificada com relação aos parâmetros plasmáticos osmorregulatórios, enquanto que um aumento no número de células cloreto nas brânquias e na atividade específica da enzima Na^+/K^+-ATPase sugeriram que ajustes branquiais adaptativos podem ter sido responsáveis pela manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico em *P. mesopotamicus* durante a situação de estresse imposta pelos parasitos. A infestação induziu também mudanças na frequência de células sanguíneas de defesa circulantes e na morfologia da epiderme dos hospedeiros. Houve uma redução no número relativo de linfócitos circulantes apenas no início da infestação, aumento no número de neutrófilos e monócitos durante praticamente todo o período experimental de dez dias e também um aumento tardio, verificado apenas no décimo dia de infestação, no número relativo de leucócitos granulócitos PAS-positivos (LG-PAS). A epiderme, considerada como sendo o primeiro nível de interação entre o hospedeiro e o parasito, apresentou um aumento na sua espessura, na diferenciação de células mucosas e uma maior infiltração por leucócitos provenientes do sangue. Todas estas respostas foram consideradas adaptativas e elas apontam para a participação do sistema imune não-adaptativo durante o período de infestação.

Um dado interessante neste estudo foi a constatação de que hospedeiros que experimentaram uma infestação prévia com *D. carvalhoi* apresentaram uma menor densidade de infestação e diferentes padrões de respostas fisiológicas, morfológicas e imunológicas quando foram submetidos a uma reinfestação. Os níveis de cortisol plasmático, por exemplo, diminuíram nos animais previamente infestados em relação ao controle, apontando para uma inibição do eixo HHI. Os macrófagos foram ativados tanto em animais infestados quanto em previamente infestados. O aumento na densidade de células mucosas na epiderme de peixes previamente

infestados sugere a participação do muco nos mecanismos de defesa e, possivelmente, na rejeição dos parasitos por parte dos hospedeiros.

Infestações crônicas com as formas jovens dos parasitos não induziram respostas ao estresse nos hospedeiros. Por outro lado, elas foram capazes de modular as respostas ao estresse em peixes que foram submetidos a um estresse agudo de confinamento. Por exemplo, quando os animais foram submetidos ao confinamento, o nível de cortisol plasmático aumentou. O mesmo não ocorreu quando os animais infestados com as formas jovens de *D. carvalhoi* foram submetidos ao mesmo tratamento. Pelo contrário, neste caso o nível de cortisol manteve-se abaixo dos níveis basais, indicando uma inibição do eixo HHI.

Considerações Finais

Além de seus efeitos diretos e negativos, a infestação por parasitos argulídeos pode causar uma série de respostas em seus peixes hospedeiros. Estas respostas podem se dar tanto em nível bioquímico, fisiológico, quanto morfológico. Os efeitos diretos estão relacionados a danos causados no tegumento dos hospedeiros, com ruptura da integridade da epiderme e consequente instalação de infecção secundária por parte de micro-organismos oportunistas. Somando-se aos efeitos diretos, os argulídeos também causam efeitos indiretos, atuando como agentes estressores aos seus hospedeiros. O estresse crônico imposto pelos parasitos pode levar a uma imunossupressão, o que torna os peixes mais susceptíveis às infecções por organismos patogênicos, já que seus mecanismos de defesa estão debilitados.

Assim, quando os sistemas de cultivo são infestados por grande número destes parasitos, as perdas normalmente estão ligadas a uma falência dos mecanismos mantenedores da homeostase iônica (desequilíbrio iônico), bem como pelo aumento da susceptibilidade às infecções secundárias.

Por outro lado, quando em baixos níveis de infestação (menor número de parasitos por peixe), algumas respostas induzidas pelos argulídeos podem ser consideradas adaptativas aos hospedeiros. O aumento nos níveis plasmáticos de cortisol, por exemplo, pode restaurar a homeostase iônica perdida em função do estresse imposto pelo parasito. Além disso, a ativação dos mecanismos de imunidade inata induzida pela infestação permite a sobrevivência dos hospedeiros ao estresse e outros danos causados pelos parasitos.

A relação entre parasito e hospedeiro é extremamente complexa e muitos dos aspectos da interação entre os argulídeos e seus peixes hospedeiros devem ser ainda esclarecidos. Portanto, estudos futuros, especialmente aqueles relacionados às espécies tropicais, são de fundamental relevância.

Referências

BAUER, O. 1959. *Diseases of Pond Fishes*. Jerusalem: Israel Program For Scientific Translations.

BENJAMINI, E.; SUNSHINE, G.; LESKOWITZ, S. 1996. Elements of innate and acquired immunity. In: BENJAMINI, E.; SUNSHINE, G.; LESKOWITZ, S. *Immunology – A short course*. New York: Wiley-Liss, p. 19-42.

BERNIER, N. J.; PERRY, S. F. 1996. Control of catecholamine and serotonin release from the chromaffin tissue of the Atlantic hagfish. *J. Exp. Biol.,* 199:2485-2497.

BERNIER, N. J.; PERRY, S. F. 1997. Angiotensins stimulate catecholamine release from the chromaffin tissue of the rainbow trout. *Am. J. Physiol.*, 273:R49-R57.

BJØRN, P. A.; FINSTAD, B. 1997. The physiological effects of salmon lice infection on sea trout post smolts. *Nord. J. Freshwater Res.,* 73:60-72.

BOWERS, J. M.; MUSTAFA, A.; SPEARE, D. J.; CONBOY, G. A.; BRIMACOMBE, M.; SIMS, D. E.; BURKA, J. F. 2000. The physiological response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., to a single experimental challenge with sea lice, *Lepeophtheirus salmonis*. *J. Fish Diseases,* 23: 165-172.

BRANDT, M.; FOITZIK, S.; FISCHER-BLASS, B.; HEINZE, J. 2005. The coevolutionary dynamics of obligate ant social parasite systems – between prudence and antagonism. *Biol. Rev*., 80:251-267.

BUCHMANN, K. 1999. Immune mechanisms in fish skin against monogeneans – a model. *Folia Parasitol.*, 46:1-9.

BUCHMANN, K.; BRESCIANI, J. 1998. Microenvironment of *Gyrodactylus derjavini* on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: association between mucous cell density in skin and site selection. *Parasit. Res*., 84:17-24.

CASTRO, F. J. 2006. *Relação parasito-hospedeiro entre pacu, Piaractus mesopotamicus e o ectoparasito Dolops carvalhoi (Lemos de Castro, 1949): respostas fisiológicas, morfofuncionais e do sistema imune não-adaptativo do hospedeiro frente à infestação experimental*. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

DONALDSON, E. M. 1981. The pituitary-interrenal Axis as an indicator of stress in fish. In: PICKERING, A. D. *Stress and fish*. London: Academic Press, p. 11-47.

EIRAS, J. C. 1994. *Elementos de Ictioparasitologia*. Porto, Portugal: Fundação Eng. Antônio de Almeida.

EPPLE, A.; NIBBIO, B. 1985. Catecholaminotropic effects of catecholamines in a teleost fish, *Anguilla rostrata. J. Comp. Physiol.*, B155:285-290.

EVANS, D. H. 1993. Osmotic and ionic regulation. In: EVANS, D. H. *The physiology of fishes*. Boca Raton: CRC press, p. 315-341.

FLIK, G.; PERRY, S. F. 1989. Cortisol stimulates whole-body calcium uptake and the branchial calcium pump in freshwater rainbow trout. *J. Endocrinol.*, 120:75-82.

FRITSCHE, R.; REID, S. G.; THOMAS, S.; PERRY, S. F. 1993. Serotonin-mediated release of catecholamines in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.*, 178:191-204.

FRYER, G. 1982. *The parasitic Copepoda and Branchiura of British freshwater fishes: A handbook and key.* Ambleside, Cumbria: Freshwater Biological Association, 87 p.

GAMPERL, A. K.; VIJAYAN, M. M.; BOUTILIER, R. G. 1994. Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 4:215-255.

GOMMERMAN, J. L.; CARROLL, M. C. 2000. Negative selection of B lymphocytes: a novel role for innate immunity. *Immunol. Rev.*, 173:120-130.

GRAVES, S. S.; EVANS, D. L.; DAWE, D. L. 1985. Antiprotozoan activity of non-specific cytotoxic cells (NCC) from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Immunol.*, 134:78-85.

GRIMNES, A.; JAKOBSEN, P. J. 1996. The physiological effects of salmon lice infection on post-smolt of Atlantic salmon. *J. Fish Biol.*, 48:1179-1194.

HAOND, C.; NOLAN, D. T.; RUANE, N. M.; ROTTLAND, J.; WEENDELAAR BONGA, S. E. 2003. Cortisol influences the host-parasite interaction between the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the crustacean ectoparasite *Argulus japonicus*. *Parasitology*, 127:551-560.

HARDIE, L. J.; CHAPPELL, L. H.; SECOMBES, C. J. 1994. Human tumor necrosis factor alfa influences rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* leucocyte responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 40:73-84.

HENRIKSON, R. C.; MATOLTSY, A. G. 1968. The fine structure of teleost epidermis. I. Introduction and filament-containing cells. *J. Ultrast. Res.*, 21:194-212.

HURTREZ-BOUSSÈS, S.; MEUNIER, C.; DURAND, P.; RENAUD, F. 2001. Dynamics of host-parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Micr. Infec.*, 3:B41-B49.

IGER, Y.; BALM P. H. M.; JENNER, H. A.; WENDELAAR BONGA, S. E. 1995. Cortisol induces stress-related changes in the skin of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 97:188-198.

IGER, Y.; JENNER, H. S.; WENDELAAR BONGA, S. E. 1994. Cellular responses in the skin of trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to temperature elevation. *Cell. Tissue Res.*, 44:921-935.

IGER, Y.; WENDELAAR BONGA, S. E. 1994. Cellular responses of the skin of carp (*Cyprinus carpio*) exposed to acidified water. *Cell. Tissue Res.*, 275:481-492.

JOHNSON, S. S.; ALBRIGHT, L. J. 1992. Comparative susceptibility and histopathology of the response of naïve Atlantic, chinook and coho salmon to experimental infection with *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). *Dis. Aquat. Organ.*, 14:179-193.

JOHNSON, S. S.; BLAYLOCK, R. B.; ELPHICK, J.; HYATT, K. D. 1996. Disease caused by the sea louse (*Lepeophtheirus salmonis*) (Copepoda: Caligidae) in wild sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) stocks of Alberni inlet, British Columbia. *Can. J. Aquat. Sci.*, 53:2888-2897.

KUBITZA, F.; KUBITZA, L. M. M. 1999. *Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados*. 3. ed. Jundiaí: Degaspari.

LAURENT, P.; PERRY, S. F. 1990. Effects of cortisol on gill chloride cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri. Cell Tissue Res.*, 259:429-442.

LE GUELLEC, D.; MORVAN-DUBOIS, G. M.; SIRE, J. Y. 2004. Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*). *Int. J. Dev. Biol.*, 48:217-231.

LESTER, R. J. G.; ROUBAL, F. 1995. Phylum Arthropoda. In: WOO, P. *Fish Disease and Disorders*, *Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections*. Wallingford, UK: CAB International, p. 475-598.

MAGNADÓTTIR, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.*, 20:137-151.

MALTA, J. C. O.; VARELLA, A. 1983. Os argulídeos (Crustacea: Branchiura) da Amazônia brasileira. 3. Aspectos da ecologia de *Dolops striata* Bouvier, 1899 e *Dolops carvalhoi* Castro, 1949. *Acta Amazonica,* 13:299–306.

MARKELL, E. K.; JOHN, D. T.; KROTOSKI, W. A. 2003. *Parasitologia Médica Markell & Voge*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F. 1981. Adrenergic responses to stress in fish. In: PICKERING, A. D. *Stress and Fish*. London: Academic Press, 49-75.

MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E. M. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 106:201-212.

MCCORMICK, S. D. 1995. Hormonal control of gill Na^+,K^+-ATPase and chloride cell function. In: WOOD, C. M.; SHUTTLEWORTH, T. J. *Cellular and molecular approaches to fish ionic regulation*. New York: Academic Press, p. 285-315.

MCDONALD, G.; MILLIGAN, L. 1997. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. *Fish stress and health in Aquaculture*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 119-144.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. 1999. Innate immune induction of the adaptive immune response. *Cold Spring Harbor Symp.*, 64:429-435.

MELINGEN, G. O. 2001. *Physiological and immunological interactions during parr-smolt transformation period in Atlantic salmon* (*Salmo salar* L.). Thesis (Dr. scient.) - University of Bergen, Norway.

MENEZES, H.; JARED, C. 2002. Immunity in plants and animals: common ends through different means using similar tools. *Comp. Biochem. Physiol.* Part C, 132:1-7.

MENEZES, J.; RAMOS, M. A.; PEREIRA, T. G.; SILVA, A. M. da. 1990. Rainbow trout culture failure in a small lake as a result of massive parasitosis related to careless fish introductions. *Aquaculture*, 89:123-126.

MESEGUER, J.; ESTEBAN, M. A.; RODRIGUEZ, A. 2002. Are thrombocytes and platelets true phagocytes? *Micro. Res. and Tech.,* 57(6):491-497.

MUSTAFA, A.; MCWILLIAMS, C.; FERNANDEZ, N.; MATCHETT, K.; CONBOY, G. A.; BURKA, J. F. 2000. Effects of sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* infestation on non-specific defence mechanisms in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Fish Shellfish Immunol.*, 10:47-59.

NANDI, J. 1962. The structure of the interrenal gland in teleost fishes. *Univ. of Calif. Publs Zool.*, 65:129-211.

NEUMANN, N. F.; STAFFORD, J. L.; BARREDA, D.; AINSWORTH, A. J.; BELOSEVIC, M. 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Devel. Comp. Immnunol.*, 25:807-825.

NOLAN, D. T.; REILLY, P.; WENDELAAR BONGA, S. E. 1999. Infection with low numbers of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* induces stress-related effects in post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish. Aquat. Sc.*, 56:947-959.

NOLAN, D. T.; HADDERINGH, R. H.; SPANINGS, F. A. T.; JENNER H. A.; WENDELAAR BONGA, S. E. 2000a. Effects of short-term acute temperature elevation on sea trout smolts (*Salmo trutta* L.) in tap water and in Rhine

water: effects on skin and gill epithelia, hydromineral balance and gill specific Na^+/K^+-ATPase activity. *Can. J. Fish. Aquat. Sc.*, 57:708-718.

NOLAN, D. T.; VAN DER SALM, A. L.; WENDELAAR BONGA, S. E. 2000b. The host-parasite relationship between the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the ectoparasite *Argulus foliaceus* (Crustacea: Branchiura): epithelial mucous cell response, cortisol and factors which may influence parasite establishment. *Contrib. Zool.*, 69: 57-63.

PEREZ-INIGO, C. 1976. *Parasitologia*. Madrid, Espanha: Hermann Blung.

PERRY, S. F.; GOSS, G. G.; LAURENT, P. 1992. The interrelationships between gill chloride cell morphology and ionic uptake in four freshwater teleosts. *Can. J. Zool.*, 70:1775-1786.

PERRY, S. F.; LAURENT, P. 1993. Environmental effects on fish gill structure and function. In: RANKIN, J. C.; JENSEN, F. B. *Fish ecophysiology*. London: Chapman & Hall, p. 231-264.

PICKERING, A. D. 1981. *Stress and fish*. London: Academic Press.

PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G. 1989. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effect of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol. Biochem.*, 7:253-258.

PIKE, A. W. 1989. Sea lice – major pathogens of farmed Atlantic salmon. *Parasitol. Today*, 5:291-297.

POOLE, W. R.; NOLAN, D. T.; TULLY, O. 2000. Modelling the effects of capture and sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infestation on the cortisol stress response in trout. *Aquacult. Res.*, 31:835-841.

POULIN, R.; FITZGERALD, G. J. 1987. The potential of parasitism in the structuring of a salt marsh stickleback community. *Can. J. Zool.*, 65: 2793-2798.

POULIN, R.; FITZGERALD, G. J. 1988. Water temperature, vertical distribution, and risk of ectoparasitism in juvenile sticklebacks. *Can. J. Zool.*, 66:2002-2005.

RANDALL, D. J.; PERRY, S. F. 1992. Catecolamines. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; FARRELL, A. P. *Fish physiology*. San Diego: Academic Press, p. 255-300.

REID, S. G.; VIJAYAN, M. M.; PERRY, S. F. 1996. Modulation of catecholamine storage and release by the pituitary-interrenal axis in the rainbow trout, *Oncrhynchus mykiss. J. Comp. Physiol.*, B165:665-676.

REID, S. G. 1999. Control of catecholamine secretion from fish chromafin cells. In: VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. *Biology of tropical fishes*. Manaus: INPA, p. 401-411.

RUANE, N. M.; NOLAN, D. T.; ROTLLANT, J.; TORT, L.; BALM, P. H. M.; WENDELAAR BONGA, S. E. 1999. Modulation of the response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) to confinement, by an ectoparasite (*Argulus foliaceus* L.) infestation and cortisol feeding. *Fish Physiol. Biochem.*, 20:43-51

RUANE, N. M.; NOLAN, D. T.; ROTLLANT, J.; WENDELAAR BONGA, S. E. 2000. Experimental exposure of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to the juvenile stages of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer) modifies the response to a second stressor. *Fish Shellfish Immunol.*, 10:451-463.

SCHALCH, S. H. C.; BELO, M. A. A.; SOARES, V. E.; MORAES, J. R. E.; MOARES, F. R. 2005. Eficácia do diflubenzuron no controle de *Dolops*

carvalhoi (Crustacea: Branchiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) naturalmente infectados. *Acta Sci. Anim. Sci.*, 27:297-302.

SECOMBS, C. J.; OLIVIER, G. 1997. Host-pathogen interactions in salmonids. In: BERNOTH, E. M.; ELLIS, A. E.; MIDTLYNG, P. J.; OLIVIER, G.; SMITH, P. *Furunculosis. Multidisciplinary fish disease research*. [S.l.]: Academic Press, p. 269-296.

SHEPHARD, K. L. 1994. Functions for fish mucus. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 4: 401-429.

SHIELDS, R. J.; GOODE, R. P. 1978. Host rejection of *Lernaea cyprinacea* L. (Copepoda). *Crustaceana*, 35:301-307.

SHIMURA, S.; INOUE, K. 1984. Toxic effects of extract from the mouth-parts of *Argulus coregoni* Thorell (Crustacea: Branchiura). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 50:729.

SIGEL, M. M.; HAMBY, B. A.; HUGGINS JUNIOR, E. M. 1986. Phylogenetic studies on lymphokines. Fish lymphocytes respond to human IL-1 and epithelial cells produce an IL-1 like factor. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 12:47-58.

STOSIK, M.; DEPTULA, W.; TRÁVNIČEK, M. 2001. Studies on the number and ingesting ability of thrombocytes in sick carps (*Cyprinus carpio*, L.). *Vet. Med. – Czech*, 46:12-16.

STOSIK, M.; DEPTULA, W.; TRÁVNIČEK, M.; BALDY-CHUDZIK, K. 2002. Phagocytic and bactericidal activity of blood thrombocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Vet. Med.*, 47:21-25.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; KRONKA, S. N. 1999. Evaluation of the haematological parameters in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) with *Argulus sp*. (Crustacea, Branchiura) infestation and treatment with organophosphate. *Revta. Bras. Zool.*, 16:553-555.

THATCHER, V. E.; BRITES-NETO, J. B. 1994. Diagnóstico, prevenção e tratamento de enfermidade de peixes neotropicais de água doce. *Rev. Bras. Med. Vet*., 16:111-128.

THOMPSON, J. N. 1994. *The coevolutionary process*. Chicago, Illinois: University of Chicago Press.

TULLY, O.; NOLAN, D. T. 2002. A review of the population biology and host-parasite interactions of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). *Parasitology*, 124:S165-S182.

VIJAYAN, M. M.; PEREIRA, C.; MOON, T. W. 1994a. Hormonal stimulation of hepatocyte metabolism in rainbow trout following an acute handling stress. *Comp. Bioch. Physiol.*, 108:321-329.

VIJAYAN, M. M.; REDDY, P. K.; LEATHERLAND, J. F.; MOON, T. W. 1994b. The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout: a study using the steroid analogue RU486. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 96: 75-84.

WALKER, P. D.; HAOND, C.; RUSSON, I. J.; WENDELAAR BONGA, S. E. 2003. Evidence of blood feeding by the crustacean ectoparasite of fish, *Argulus japonicus* Thiele (Crustacea: Branchiura). Conference Proceedings, *11th International Conference of the EAFP – Diseases of Fish and Shellfish.*

WALKER, P. D.; FLIK, G.; WENDELAAR BONGA, S. E. 2004. The biology of parasites from the genus *Argulus* and a review of the interactions with its

host. In: WIEGERTJES, G.; FLIK, G. (Ed.). *Host-Parasite Interactions.* Abingdon, Oxon, UK; New York: BIOS Scientific Publishers, p. 107-129.

WEDEMEYER, G. A.; MCLEAY, D. J. 1981. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In: PICKERING, A. D. *Stress and fish*. London: Academic Press, p. 247-275.

WENDELLAR BONGA, S. E. 1997. The Stress Response in Fish. *Physiol. Rev.*, 77:591-625.

WIKEL, S. K.; RAMACHANDRA, R. N.; BERGMAN, D. K. 1994. Tick-induced modulation of the host immune response. *Int. J. Paras.*, 24:59-66.

WOO, P. T. K.; SHARIFF, M. 1990. *Lernaea cyprinacea* L. (Copepoda: Caligidea) in *Helostoma temminicki* Cuvier & Valenciennes: the dynamics of resistance in recovered and naïve fish. *J. Fish Dis.*, 13:485-493.

WOOTTEN, R.; SMITH, J. W.; NEEDHAM, E. A. 1982. Aspects of the biology of the parasitic copepods *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus elongatus* on farmed salmonids, and their treatment. *Proc. Royal Soc.*, 81B:185-197.

ZADUNAISKY, J. A. 1984. The chloride cell: the active transport of chloride and the paracellular pathways. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. *Fish physiology*. New York: Academic Press, I/B, p. 129-176.

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 16

Infecções parasitárias e parâmetros sanguíneos em *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) cultivados no estado do Amazonas, Brasil

Cleusa Suzana Oliveira de Araújo, Marcos Tavares-Dias, Ana Lúcia Silva Gomes, Sanny Maria Sampaio Andrade, Jefferson Raphael Gonzaga Lemos, Adriano Teixeira de Oliveira, Wanessa Ribeiro Cruz & Elizabeth Gusmão Affonso

Resumo
Neste capítulo, apresentam-se resultados de estudos sobre as infecções parasitárias e o quadro sanguíneo de pirarucu Arapaima gigas em cultivo intensivo e semi-intensivo na Amazônia central. Nesta importante espécie para a aquicultura amazônica, foram descritas as infecções causadas por protozoários e metazoários e os efeitos do parasitismo por Monogenoidea em parâmetros bioquímicos, eritrocitários, trombócitos e leucócitos. Além disso, foram relatadas as características citoquímicas de trombócitos e leucócitos, os parâmetros sanguíneos em peixes de diferentes idades e quando suplementados na ração com vitaminas C e E. Este é o primeiro estudo sobre os efeitos de infecções parasitárias em parâmetros sanguíneos do pirarucu em ambiente cultivado.

Abstract
In chapter, the results of studies on parasitic infections rates and blood parameters for pirarucu Arapaima gigas kept in intensive and semi-intensive culture from the Amazonian central it was presented. In this important fish for Amazonian aquaculture, the infections caused by protozoan and metazoan parasites and the effects of the parasitism by Monogenoidea in biochemical and red blood cells parameters, thrombocytes and leukocytes counts were

described. Furthermore, cytochemical features of thrombocytes and leukocytes and blood parameters in fish of differentages, as well as blood parameters in fish supplemented with vitamins C and E were reported. Thiswas the first report on the effects of parasitic infections in hematological parameters of for farmed pirarucu.

Introdução

O pirarucu *Arapaima gigas*, é uma espécie endêmica da bacia amazônica e chega a medir 3 m de comprimento e a pesar 200 kg. Essa espécie piscívora, é um dos peixes que apresenta as melhores perspectivas para a criação em qualquer modalidade de cultivo na Amazônia. Sua respiração aérea obrigatória facilita a criação quando em águas com baixa disponibilidade de oxigênio dissolvido, o que não é possível nos peixes de respiração branquial obrigatória. Apresenta grande velocidade de crescimento, podendo alcançar 7-10 Kg no primeiro ano de cultivo. Tem rusticidade ao manuseio e facilidade no treinamento para aceitar ração balanceada, além de suportar altas densidades de estocagem (Imbiriba, 2001; Ono et al., 2003, 2004; Cavero et al., 2003; Cavero et al., 2003; Brandão et al., 2006; Andrade et al., 2007). Portanto, todos esses fatores positivos vêm impulsionando o cultivo do pirarucu no estado do Amazonas, bem como em outras regiões da Amazônia.

A aquicultura é, atualmente, responsável por 45% da produção de animais aquáticos usados para a alimentação do homem. Porém, o mercado consumidor requer demanda de produtos seguros e de qualidade (Subasinghe et al., 2009), e isso inclui também a produção de peixes. O sucesso da piscicultura depende de vários fatores, dentre os quais as condições sanitárias é um dos mais importantes, se não o mais relevante. Como em todos os sistemas de produção animal, as doenças parasitárias são consideradas fatores limitantes à produção de peixes e estas vem se expandindo na indústria da aquicultura. Assim, no cultivo de peixes, como nos demais tipos de produção animal, as condutas de manejo necessitam de observação, especialmente do ponto de vista sanitário (Pavanelli et al., 2008; Araújo et al., 2009), para garantir um produto de qualidade e o sucesso econômico a que se propõe esta atividade. Caso contrário, as doenças poderão ser responsáveis por epizootias na piscicultura e ocasionar perdas econômicas significativas, consequentemente, levando os produtores ao desestímulo (Araújo et al., 2009).

Os parâmetros sanguíneos podem ser usados como indicadores biológicos no monitoramento da saúde dos peixes e do ambiente, como uma rápida ferramenta na identificação do estresse que o ambiente pode impor aos peixes. Assim, estas informações poderiam ser utilizadas para avaliar e controlar o estado fisiológico de determinado peixe, padronizando as condições ideais para o seu cultivo (Svetina et al., 2002). Por isso, os estudos sobre o quadro hematológico de peixes, em cativeiro, têm aumentado consideravelmente nas últimas décadas. Mas apesar deste incremento na determinação de valores de referência para parâmetros sanguíneos de vários peixes, muitas vezes, os leucócitos ainda são motivos de grande controvérsia

(Tavares-Dias & Moraes, 2004; Tavares-Dias & Barcellos, 2005; Tavares-Dias, 2006a).

Devido às variações morfológicas dos granulócitos, durante seu amadurecimento, uma análise baseada somente na morfologia pode ser insuficiente para identificação de populações leucocitárias. Os constituintes enzimáticos e não enzimáticos destas células podem ser demonstrados por métodos citoquímicos (Tavares-Dias, 2006a; Tavares-Dias & Moraes, 2006b; Shigdar et al., 2009). Estes métodos além de serem úteis para identificação das populações dos leucócitos, podem ser usados para compreensão do desenvolvimento destas células e de suas funções imunológicas (Ueda et al., 2001; Tavares-Dias & Barcellos, 2005; Rough et al., 2005; Tavares-Dias, 2006a). Os leucócitos possuem proteínas no núcleo e no citoplasma. Entre as proteínas citoplasmáticas, as enzimas são as mais importantes e estão ligadas às granulações dessas células. As proteínas não-enzimáticas são de menor importância, uma vez que não são usadas durante processo fagocítico e morte dos micro-rganismos, como ocorre com as enzimas. Os granulócitos maduros possuem granulações secundárias ou específicas, as quais são menores que as granulações das células jovens. Além dos constituintes enzimáticos dos leucócitos (peroxidase, esterases, fosfatases e outras) há também os carboidratos e lipídeos (Hayhoe & Quaglino, 1994; Lorenzi, 1999). Existem vários métodos citoquímicos para a localização dessas substâncias nos leucócitos e a maioria desses métodos baseia-se na produção de um precipitado corado.

Este capítulo, resultado pesquisas relacionados com os parasitos de pirarucu em diferentes tipos de cultivo, bem como a relação desses parasitos com a hematologia, pretende contribuir para o subsídio do desenvolvimento do cultivo deste importante peixe nativo da Amazônia, além de dar suporte para novas pesquisas na área.

Parasitos do pirarucu em ambiente natural

Os primeiros estudos sobre parasitofauna do pirarucu em ambiente natural tiveram início com Baylis (1927) e Travassos et al. (1928). Posteriormente, Thatcher (1991, 2006) revisou os parasitos descritos para o pirarucu na Amazônia. Porém, grande parte das informações sobre os parasitos que albergam o pirarucu, ao longo de cem anos de publicações, está dispersa na literatura e novos parasitos foram descritos. Assim, essas informações foram reunidas na Tabela 1, e mostram que o pirarucu possui uma rica fauna de parasitos metazoários, abrangendo espécies de Myxozoa, Monogenoidea, Nematoda, Cestodaria, Digenea, Crustacea, Achantocephala e Pentastomida. Estes estudos, em sua maioria descrições taxonômicas, foram conduzidos em pirarucus coletados em rios da Amazônia (Malta, 1982; Kritsky et al., 1985; Thatcher, 1980, 1991, 2006; Gomes et al., 2006; Santos et al., 2008) e recentemente, novos relatos foram em espécimes do Rio Araguaia, Mato Grosso, Brasil (Feijó et al., 2008; Santos et al., 2008).

Os parasitos são as maiores causas de infecções em peixes cultivados. Assim, a preocupação dos pesquisadores não é apenas avaliar o impacto dos parasitos em populações de peixes em seu ambiente natural, mas também ampliar os conhecimentos sobre as estratégias usadas pelos diferentes parasitos. Essas informações, além de explicar a presença ou ausência de

determinadas espécies de parasitos nos peixes, bem como as taxas de parasitismo (Pavanelli et al., 2004), podem também auxiliar na estratégia de medidas de profilaxia e tratamento, quando este peixe estiver em condições de cultivo.

Tabela 1. Parasitos metazoários do *A. gigas* em ambiente natural.

Grupo Taxonômico	Gênero/Espécie/Autor	Localização no hospedeiro
Monogenoidea	*Dawestrema cycloancistrioides* Kritsky, Boeger & Thatcher, 1985 *Dawestrema cycloancistrium* Price & Nowlin, 1967 *Dawestrema punctatum* Kritsky, Boeger & Thatcher, 1985	Brânquias/pele
Digenea	*Caballerotrema arapaimense* Thatcher, 1980 *Caballerotrema brasiliense* Thatcher, 1980 *Caballerotrema piscicola* Kohn & Fernandes, 1981	Intestino
Cestodaria	*Nesolecithus janicki* Poche, 1922 *Schizochoerus liguloideus* Diesing, 1850	Cavidade abdominal
Nematoda	*Goezia spinulosa* Diesing, 1839 *Terranova serrata* Drasche, 1884 *Nilonema senticosa* Baylis, 1927 *Procamallanus inopinatus* Travassos, 1929 *Procamallanus rarus* Travassos,1929 *Gnaostoma gracilis* Diesing, 1839 *Camallanus tridentatus* Drasche, 1884 *Rumai rumai* Travassos, 1960 *Capillostrongyloides arapaimae* Santos, Moravec & Venturieri, 2008	Estômago, intestinos, cecos pilóricos e bexiga natatória
Achantocephala	*Polyacanthorhynchus macrorhynchus* Diesing, 1836 *Polyacanthorhynchus rhopalorhynchus* Diesing, 1851	Intestino
Copepoda	*Ergasilus* sp.	Narinas
Branchiura	*Dolops discoidalis* Bouvier, 1899 *Argulus* Muller, 1785	Pele
Pentastomida	*Sebekia* Sambon, 1922	Estômago
Myxozoa	*Henneguya arapaima* Jeijó, Arana, Cecarelli & Adriano, 2008	Brânquias e nadadeiras

Parasitos de pirarucus em cultivo intensivo

Na estação de piscicultura experimental da Coordenação de Pesquisas em Aquacultura (CPAQ)/INPA (Manaus, AM), no período de abril de 2005 a junho de 2006, durante cultivo de 3400 alevinos de *A. gigas* (5,0-12,0cm e 5,5-12,0g), 19,7% apresentaram infecção nas brânquias e pele por *Dawestrema* Price & Nowlin, 1967 (Dactylogyridae); 23,5% por bactérias e 1,0% por *Trichodina* Ehrenberg, 1834 (Protozoa). Esses parasitos ocasionaram três casos de mortalidade, com um total de 1.250 alevinos mortos, devido ao excesso de matéria orgânica no viveiro e/ou após transporte dos alevinos. Em todos os casos de mortalidade os peixes eram alevinos, demonstrando assim uma maior susceptibilidade do pirarucu nesta fase de criação. Para o controle das infecções causadas por parasitos do gênero *Dawestrema* e *Trichodina* foi usado 10 g/L de NaCl, em três banhos consecutivos, com duração de 15 minutos cada.

Parasitos de pirarucus cultivados em tanques-rede

Juvenis de pirarucu (0,25 g e 4,0 cm) adquiridos de piscicultura comercial foram mantidos na Estação Experimental de Piscicultura da Coordenação de Pesquisas em Aquacultura (CPAQ) do INPA/Manaus, Brasil. Quando esses peixes estavam com 5,0 cm e 0,5 g de peso foram transferidos para tanque-rede de malha de tecido de 1 m^3 de volume instalado em viveiro de 50 m^2, para o condicionamento alimentar. Na sequência, os peixes passaram a ser alimentados com uma mistura inicial contendo 98% de farinha de peixe e 2% de premix vitamínico e mineral, com ração comercial contendo 40% de proteína bruta em proporções de 90:10, respectivamente. Semanalmente, a mistura das rações foram alteradas gradualmente (75:25, 50:50, 25:75), chegando ao final da transição gradual apenas com a ração comercial (Ono et al., 2003, 2004). Em seguida, os peixes foram transferidos para um viveiro de 120 m^2, permanecendo até o tamanho adequado para criação em tanques-rede.

Peixes com peso médio de 2132,8 ± 42,4 g foram então transferidos para tanques-rede, em uma barragem, em uma propriedade comercial de Iranduba (AM, Brasil). Nestes tanques-rede, os peixes foram alimentados com ração extrusada suplementada com 800 mg/kg de vitamina C, seguindo recomendações prévias (Menezes et al., 2006; Andrade et al., 2007). Durante 210 dias, duas vezes ao dia, os peixes foram alimentados, até a saciedade aparente, com rações contendo de 36% a 48% de proteína bruta. Ao final deste período, 46 peixes necropsiados tiveram a pele, brânquias e trato gastrointestinal examinados, para verificação da presença de parasitos.

A nomenclatura dos índices parasitários (prevalência, intensidade média, variação de intensidade, abundância média) adota aqui para avaliação do nível de infecção, foi a recomendada por Bush et al. (1997) e a dominância relativa média segundo Rhode et al. (1995).

Durante o período experimental os parâmetros da qualidade de água da barragem não apresentaram variações (Tabela 2), mantendo-se dentro dos limites considerados adequados para o desempenho produtivo e a manutenção da saúde de peixes tropicais de água doce.

As brânquias de 100% dos espécimes de pirarucu analisados estavam infectadas por parasitos do gênero *Trichodina* Ehrenberg, 1834, *Dawestrema* Price & Nowlin, 1967 e *Argulus* Muller, 1785 com intensidade variável. *Trichodina* sp. foi o parasito dominante, seguido por *Dawestrema* sp. (Tabela 3). Porém, o exame parasitológico gastrintestinal não revelou qualquer parasito. Todos os peixes examinados apresentaram parasitos devido ao seu adensamento e a baixa circulação da água da barragem onde estavam inseridos os tanques-rede. No entanto, a diversidade de parasitos foi baixa se comparada à descrita para pirarucus em ambiente natural.

Tabela 2. Parâmetros da qualidade da água para *A. gigas* cultivados em tanques-rede.

Parâmetros	Média ± Desvio padrão
Oxigênio dissolvido (mg/L)	6,83 ± 1,41
Temperatura (ºC)	29,8 ± 0,63
pH	5,59 ± 0,78
Condutividade elétrica (µS/cm)	7,58 ± 0,41
Amônia total (mg/L)	1,24 ± 0,88
Nitrito (mg/L)	0,007 ± 0,005
Alcalidade total (mg $CaCO_3$/L)	3,64 ± 0,44
Dureza total (mg $CaCO_3$/L)	2,43 ± 1,58

Tabela 3. Índices parasitários em *A. gigas* cultivados em tanques-rede, Iranduba (AM).

Espécies de parasitos	*Trichodina* sp.	*Dawestrema* sp.	*Argulus* sp.
Peixes examinados	46	46	46
Peixes parasitados	46	46	27
Prevalência (%)	100	100	58,7
Amplitude de intensidade	306-7595	37-1400	1-5
Intensidade média	132	21	51
Dominância relativa média	0,862	0,137	0,0003

Parasitos de pirarucus cultivados em piscicultura semi-intensiva

Em um período de 21 meses, foram coletados 295 espécimes de *A. gigas* (7,31 ±1,93 a 72,5 ± 0,7 cm) de uma mesma piscicultura de cultivo semi-intensivo. Após a coleta dos peixes foi feita necropsia para estudo parasitológico. A contagem dos protozoários foi estimada, avaliando-se o

número de parasitos/campo da lâmina do raspado de pele e das brânquias. A prevalência de *Trichodina* sp. foi elevada, principalmente no tegumento (Figura 1 e Tabela 4).

Tabela 4. Índices parasitários de *Trichodina* sp. em *A. gigas* de piscicultura semi-intensiva.

Local de fixação	Prevalência (%)	Intensidade média	Abundância
Tegumento	41,7	29,0	12,1
Brânquias	24,4	15,0	3,7
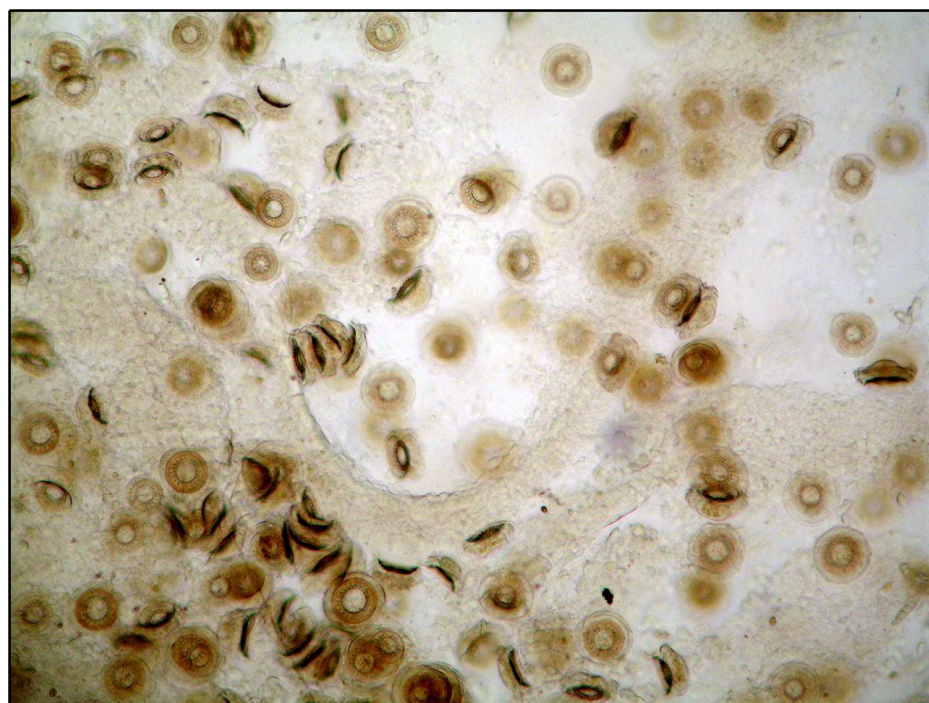
Figura 1. Infecção maciça de *Trichodina* sp. no tegumento em *A. gigas* de piscicultura semi-intensiva.

Os peixes também estavam altamente parasitados por helmintos. Nas brânquias houve parasitismo por Monogenoidea *Dawestrema cycloancistrium* e *D. cycloancistrioides* (Tabela 5) e no trato digestório, por Nematoda tais como *Terranova serrata, Camallanus tridentatus, Goezia spinulosa* e Larvas tipo IV (Tabela 6).

Infecções por *D. cycloancistrioides* e *D. cycloancistrium* ocorreram em peixes de todos os tamanhos (idades) e mostraram relativo aumento com crescimento dos peixes (Tabela 6). Porém, estudos prévios de correlação usando somente alevinos de *A. gigas* em várias idades e comprimento corporal, indicaram o incremento do número destes parasitos com o crescimento corporal dos peixes (Araújo et al., 2009). Contudo, isso não se confirmou quando peixes de 10,0-79,0 cm foram usados, no presente estudo.

Tabela 5. Índices parasitários de *D. cloancistrium* e *D. cycloancistrioides* (Monogenoidea) em relação ao comprimento médio de *A. gigas* de piscicultura semi-intensiva.

Comprimento (cm)	Prevalência (%)	Intensidade média	Abundância
7,31	45,8	3,18	1,46
15,10	83,9	219,53	184,32
23,59	98,6	256,51	253,04
34,85	100	153,85	153,85
45,88	100	309,77	309,77
52,27	100	266,52	266,52
63,83	33,3	191,50	63,83
72,50	100	5,5	5,5

Tabela 6. Índices parasitários de Nematoda em relação ao comprimento médio de *A. gigas* de piscicultura semi-intensiva.

Comprimento (cm)	Prevalência (%)	Intensidade média	Abundância
7,31	8,3	1	0,08
15,10	24,5	2	0,49
23,59	29,7	2,95	0,88
34,85	7,69	4	0,31
45,88	34,62	7,22	2,5
52,27	52,4	12,09	6,33
63,83	33,3	38	12,67
72,50	0	0	0

O cultivo de peixes provém condições ideais para a transmissão de doenças parasitárias (Garcia et al., 2009), como está demonstrado aqui. Os tricodinídeos são protozoários parasitos que podem ocasionar grandes perdas econômicas em pisciculturas quando há manejo inadequado (Martins & Ghiraldelli, 2008; Pavanelli et al., 2008; Garcia et al., 2009). Na forma

branquial da enfermidade, a morte dos peixes se deve principalmente à asfixia. O grau de infecção depende diretamente da qualidade da água, densidade de estocagem e estado nutricional, os quais predispõem os peixes à manifestação da tricodiníase (Pavanelli et al., 2008; Garcia et al., 2009).

Os Monogenoidea estão entre os parasitos mais significativos para a piscicultura e podem provocar taxas de mortalidades elevadas (Pavanelli et al., 2008). Estes são, em geral, parasitos hospedeiro/específico, mas algumas espécies apresentam baixa especificidade (Thatcher, 2006). Das espécies conhecidas albergando o *A. gigas* na natureza, somente *D. cycloancistrioides e D. cycloancistrium* foram encontradas nas brânquias deste hospedeiro em piscicultura semi-intensiva, neste trabalho. Parece não haver então uma competição entre estas espécies de Monogenoidea nas brânquias do pirarucu. Simvoká et al. (2000) relataram que, em geral, não há competição na distribuição de Monogenoidea congenérica, e a interação entre as espécies não é o mais importante para determinar o tamanho do nicho, mas sim a abundância.

Alterações sanguíneas em pirarucus parasitados por Monogenoidea

Pirarucus *A. gigas* (10,0-79,0 cm) coletados em viveiros de piscicultura semi-intensiva para estudos das infecções parasitárias e avaliação dos parâmetros sanguíneos apresentaram as brânquias infectadas por *Dawestrema cycloancistroides* e *D. cicloancistrium*, com número de parasitos variando de 100 a 1534 Monogenoidea/peixe.

O parasitismo por Monogenoidea *D. cycloancistroides* e *D. cicloancistrium* causou redução dos níveis plasmáticos de proteínas totais e cloreto, acompanhado de aumento dos níveis de glicemia, hemoglobina, concentração de hemoglobina corpuscular (CHCM), número de leucócitos e linfócitos (Tabela 7). Estes resultados em *A. gigas* mostraram que infecções moderadas de Monogenoidea não causaram processo anemiante, uma vez que houve aumento dos níveis de hemoglobina e número de eritrócitos. Porém, causaram distúrbios osmorregulatórios, leucocitose e linfocitose neste hospedeiro.

Em carpas *Cyprinus carpio* parasitadas por Monogenoidea e copepoditos também foi descrito aumento do número de eritrócitos, mas com redução do hematócrito, número de neutrófilos e monócitos (Ghiraldelli et al., 2006). Por outro lado, em pacus *Piaractus mesopotamicus* e piauçu *Leporinus macrocephalus* parasitados por Monogenoidea, protozoários (*Piscinoodinium pillulare*, *Ichthyophthirius multifiliis, Trichodina* sp.) e crustáceos (*Lernaea cyprinacea*) não houve alteração nos níveis de hemoglobina, hematócrito e CHCM (Tavares-Dias et al., 1999a, 2008), somente ativação de leucócitos (Tavares-Dias et al., 2008). Em tilápias *Oreochromis niloticus* parasitadas por Monogenoidea, protozoários (*Trichodina* sp. e *Epystilis* sp.) e crustáceos (*Lamproglena* sp. e *Argulus*) foi relatado anemia devido à redução do número de eritrócitos e hematócrito, acompanhada de trombocitopenia, leucopenia, linfopenia, neutrofilia e monocitofilia (Ghiraldelli et al., 2006).

Em híbrido tambacu, o parasitismo pelo crustáceo *Dolops carvalhoi*, causou redução do hematócrito e níveis de magnésio, com aumento dos níveis de glicose, proteínas totais, sódio, cloreto, número de monócitos e leucócitos granular PAS-positivos (Tavares-Dias et al., 2007b). O quadro

sanguíneo de peixes parasitados por crustáceos *Argulus foliaceus* (Ranzani-Paiva et al., 1987; Tavares-Dias et al., 1999b), *A. japonicus* (Ruane et al., 1999) e *L. cyprinacea* (Silva-Souza et al., 2000) também sofreu alterações influenciadas pelo parasitismo. Por outro lado, infecções por tais parasitos não influenciaram os parâmetros hematológicos de tainhas *Mugil platanus* (Ranzani-Paiva et al., 1997), *Oreochromis niloticus* (Azevedo et al., 2006) e tambacu (Tavares-Dias et al., 2008). Portanto, há uma resposta diferenciada dos peixes para as diferentes espécies de parasitos, carga parasitária e/ou resposta distinta às ações dos diferentes parasitos.

Tabela 7. Parâmetros bioquímicos, eritrocitários e tromboleucocitários de *A. gigas* parasitados por *D. cycloancistroides* e *D. cicloancistrium*. Valores expressam as médias ± desvio padrão.

Parâmetros	Controles	Parasitados
Proteína total (g/dL)	2,9 ± 0,8a	2,5 ± 1,0b
Glicose (mg/dL)	89,3 ± 32,9b	107,3 ± 36,8a
Sódio (mmol/L)	142,5 ± 8,6a	140,8 ± 15,7a
Potássio (mmol/L)	2,8 ± 0,8a	3,0 ± 1,2a
Cloreto (mmol/L)	52,2 ± 15,7a	45,2 ± 15,7b
Eritrócitos (x $10^6/\mu L$)	1,902 ± 0,44b	2,029 ± 0,59a
Hemoglobina (g/dL)	8,8 ± 2,0b	10,0 ± 2,6a
Hematócrito (%)	31,2 ± 7,4a	31,9 ± 6,0a
VCM (fL)	173,5 ± 52,6a	171,6 ± 64,8a
CHCM (g/dL)	28,4 ± 7,7b	31,5 ± 7,7a
Trombócitos (μL)	9991 ± 2664a	11889 ± 9704a
Leucócitos (μL)	12799 ±3159b	14642 ± 6025a
Linfócitos (μL)	9545 ± 2288b	11001± 4927a
Monócitos (μL)	447 ± 342a	475 ± 655[a]
Neutrófilos (μL)	851 ± 653a	815 ± 657[a]
Eosinófilos (μL)	1966 ± 1037a	2168 ± 1428a

Letras diferentes, na mesma linha, indicam diferenças significativas ($p<0,05$) pelo teste *t* de Student.

Parâmetros sanguíneos de pirarucus suplementados com vitaminas C e E

Em *A. gigas*, na fase juvenil, foi avaliada a eficácia das vitaminas C (ácido ascórbico ou AA) e E (α-tocoferol ou α-T) como imunoestimulantes. Os experimentos foram realizados em condições laboratoriais (Andrade et al., 2007) e em sistema de criação em tanques-rede (Menezes et al., 2006), nos quais foram avaliados o desempenho e os parâmetros sanguíneos dos peixes.

Para os experimentos em condições laboratoriais, foram utilizados 315 peixes (115,8 ± 2,2 g), os quais foram distribuídos em 21 tanques de PVC de 500 L com 15 peixes cada e submetidos a 7 tratamentos: controle – ração comercial com 40% de proteína bruta (10% de gorduras totais, 5% de fibras

totais, 12 % de cinzas, 8% de umidade com 100 mg α-T kg^{-1} e 350 mg AA kg^{-1}); C500, C800, C1200, E500, E800 e E1200 - ração comercial com 40% PB suplementada com 500, 800 e 1200 mg AA polifostato kg^{-1} e α-T kg^{-1} respectivamente. Cada tratamento teve três réplicas, e os peixes foram alimentados duas vezes ao dia durante 60 dias.

A suplementação adequada de vitaminas C e E na ração de peixes, sob criação intensiva, é essencial para aumentar a sobrevivência e o desempenho dos animais (Chagas & Val, 2003; Chen et al., 2004; Lin & Shiau, 2005; Affonso et al., 2007). Entretanto, após 60 dias alimentados com dietas suplementadas com superdoses de vitaminas C e E, os pirarucus não apresentaram diferenças significativas em seu crescimento (Figura 1). Provavelmente, as vitaminas C (350 mg kg^{-1}) e E (100 mg kg^{-1}) da ração comercial foram suficientes para manter o desempenho dos peixes, como observado no tratamento controle. Esses resultados corroboram aqueles relatados para outras espécies de peixes (Henrique et al., 1998; Ortuño et al., 2003; Tort et al., 2004).

Entretanto, tem sido verificado que as concentrações de vitaminas necessárias para a estimulação imunológica são muito maiores do que aquelas necessárias para o crescimento dos peixes (Verlhac et al., 1996; Henrique et al., 1998; Ortuño et al., 2003). Isso é importante porque, em sistema de cultivo, os peixes são expostos a vários agentes estressores potenciais, os quais causam uma série de respostas fisiológicas conhecidas como estresse (Barton, 2002). Uma das consequências é a imunossupressão dos animais, e as vitaminas C e E podem melhorar a defesa dos organismos através da suplementação na dieta (Montero et al., 2001; Ortuño et al., 2003; Belo et al., 2005).

Valores médios da glicose e proteínas totais em pirarucus são mostrados na Figura 2. Alguns indicadores do estado oxidativo também foram avaliados em pirarucus alimentados com rações suplementadas com vitaminas C e E. O hematócrito (Ht), concentração de hemoglobina ([Hb]), número de eritrócitos (RBC), volume corpuscular médio (MCV), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) e número de leucócitos totais (WBC) de pirarucus alimentados com diferentes dietas durante 60 dias estão representados na Figura 3. Os resultados demonstraram aumento significativo ($p<0,05$) no RBC do tratamento com 800 e 1200 mg AA kg^{-1} e a [Hb] no tratamento com 500 mg α-T kg^{-1} em relação ao controle. O aumento significativo da MCHC no tratamento E500 é uma consequência do aumento na [Hb] dos peixes. A diminuição do MCV nos tratamentos C800 e C1200 em relação ao controle é uma resposta ao aumento de eritrócitos circulantes totais (RBC) nos dois tratamentos.

Altas concentrações de vitaminas C e E podem aumentar a síntese de proteínas (Chagas & Val, 2003). Os peixes de todos os tratamentos com suplementação de vitaminas, exceto C500, tiveram valores elevados de proteínas totais comparados àqueles do controle. Portanto, esses resultados sugerem uma importante função de ambas as vitaminas na modulação das proteínas do plasma. Em pirarucus, os valores de glicose plasmática demonstraram hiperglicemia nas concentrações de 800 e 1200 mg α-T kg^{-1} em relação ao controle e as concentrações de vitamina C. Entretanto, não é possível afirmar se a hiperglicemia é ou não uma vantagem para os pirarucus, uma vez que há falta uma padronização da suplementação de

vitamina E, cujas implicações metabólicas precisam ser ainda melhor investigadas.

Para concluir, os resultados confirmam que altas doses de vitamina C, particularmente 800 e 1.200 mg AA kg^{-1}, alteram o perfil fisiológico do pirarucu e, provavelmente, o protege de situações de estresse. Ao contrário, superdoses de vitamina E parece não produzir respostas positivas na hematologia de pirarucu sob as condições testadas.
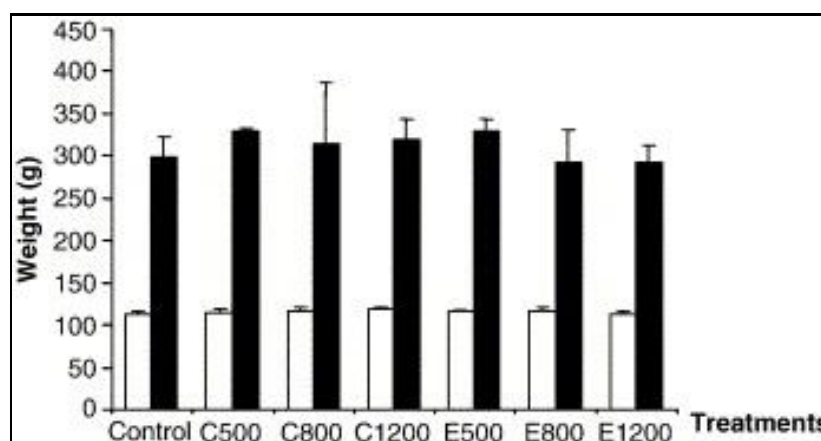
Figura 1. Peso (g) inicial (□) e após 60 dias de experimento (■) com *A. gigas* alimentado com diferentes dietas. Controle = ração comercial; C500; C800 e C1200 com 500, 800, 1200 mg AA kg^{-1} e E500, E800, E1200 com 500, 800, 1200 mg α-T kg^{-1}. Media ± D.P., n = 21 (teste de Kruskal–Wallis, p<0,05).
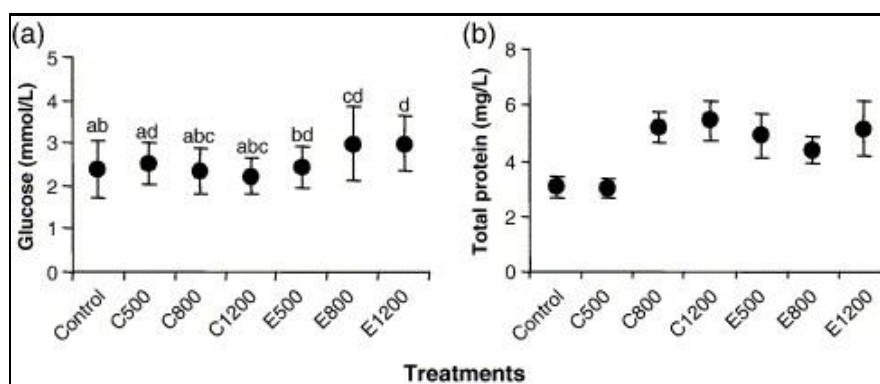
Figura 2. Glicose plasmática (a) e proteína total (b) de *A. gigas* submetidos a diferentes tratamentos por 60 dias. Controle = ração comercial; C500; C800 e C1200 com 500, 800, 1200 mg AA kg^{-1} e E500, E800, E1200 com 500, 800, 1200 mg α-T kg^{-1}. Media ± D.P, n = 21. Diferentes letras significam diferenças significativas (teste de Kruskal–Wallis, p<0,05).
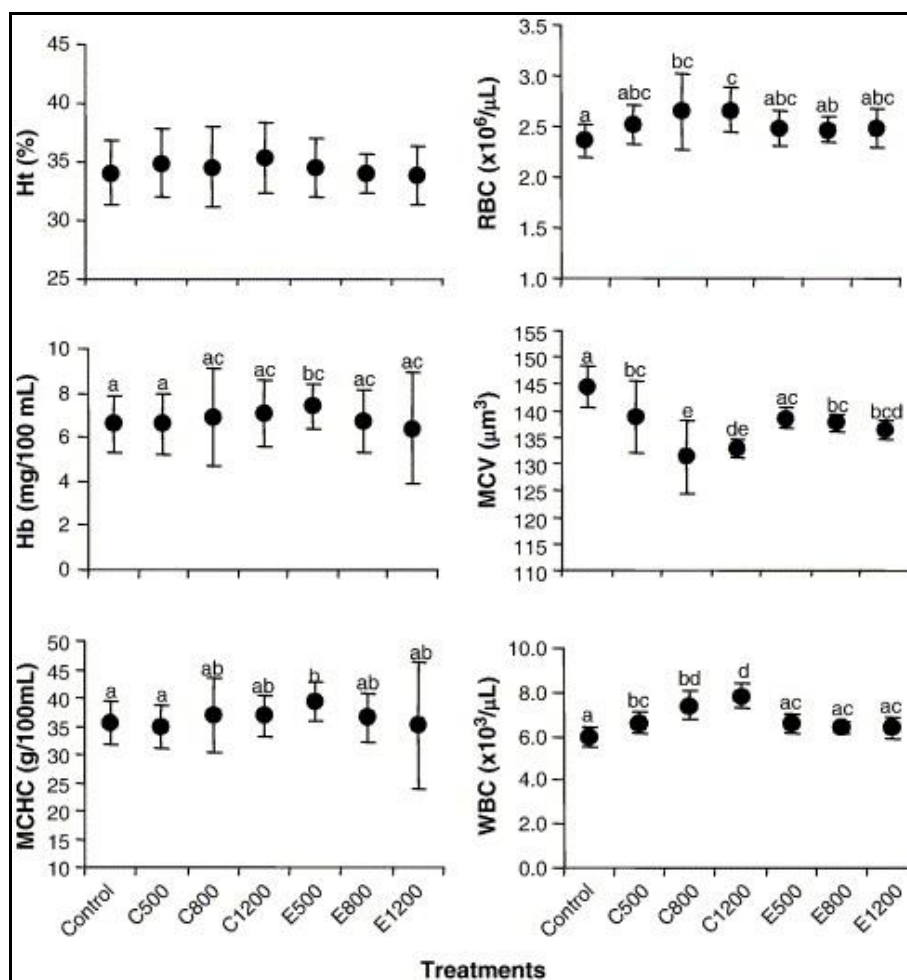
Figura 3. Hematócrito (Ht), número de eritrócitos (RBC), concentração de hemoglobina ([Hb]), volume corpuscular médio (MCV), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) número de leucócitos (WBC) de *A. gigas* alimentado com dietas experimentais por 60 dias. Controle = ração comercial; C500; C800 e C1200 com 500, 800, 1200 mg AA kg^{-1} e E500, E800, E1200 com 500, 800, 1200 mg α-T kg^{-1}. Media ± D.P, *n* = 21. Diferentes letras significam diferenças significativas (teste de Kruskal–Wallis, p<0,05).

A partir dos resultados supramencionados, foi realizado outro experimento para avaliar o efeito de superdoses de vitaminas C (800 mg AA $kg^{-}1$) e E (500 mg α-T kg^{-1}) e a interação C+E (800 mg AA + 500 mg α-T $kg^{-}1$) em *A. gigas*, sob sistema de criação em tanques-rede por 45 dias. Para tal, foram utilizados 264 peixes (486,9 ± 75,1 g), distribuídos em 12 tanques-rede de 1 m^3 com 12 peixes cada. O desenho experimental consistiu de 4

tratamentos: Controle - ração comercial 40 % PB (mesma composição da dieta descrita acima); E500, C800 e C800 + E500 - ração comercial com 40% de proteína bruta suplementada para conter 500 mg α-T kg^{-1}, 800 mg AA polifosfatos e 500 α-T + 800 AA polifosfatos kg^{-1}. O experimento foi realizado com três réplicas por tratamento e os peixes foram alimentados duas vezes ao dia.

Os resultados de desempenho de juvenis de pirarucu criados em tanques-rede e suplementados com rações contendo vitamina C, E e C+E, apresentaram aumento significativo ($p<0,05$) no ganho de peso se comparado aos do controle (Figura 4). A comparação do peso dos peixes nos tratamentos C800 e C+E não demonstraram diferenças significativas, embora os valores médios obtidos em ambos os tratamentos tenham sido significativamente mais elevados ($p<0,05$) do que aqueles do tratamento E500. A taxa de sobrevivência dos peixes do controle foi de 91,7%, e não houve mortalidade nos tratamentos com elevadas concentrações de vitaminas.
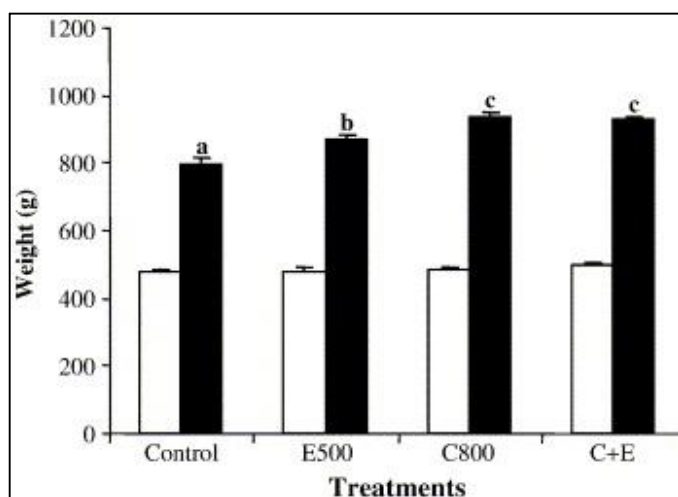
Figura 4. Peso (g) inicial (□) e após 45 dias de experimento (■) com *Arapaima gigas* alimentados com diferentes rações. Controle = ração comercial; C800 = 800 mg AA kg^{-1}; E500 = 500 mg α-T kg^{-1}; C+E = 800 mg AA + 500 mg α-T kg^{-1}. Média ± D.P.; n=18. Letras diferentes indicam diferenças significativamente (teste de Tukey, $p<0,05$).

Em condições de campo, o confinamento de pirarucus no sistema de produção em tanque-rede foi utilizado como agente estressor, para avaliar a eficácia das vitaminas C e E e a interação C+E. A escolha deste sistema de produção deve-se aos bons resultados comparados aos sistemas tradicionais

(viveiros escavados e barragens) do ponto de vista econômico, técnico, ambiental e social (Ono & Kubitza, 2003; Ono, 2005).

Como descrito nos experimentos realizados em condições laboratoriais, os parâmetros hematológicos foram bons indicadores dos efeitos das vitaminas C e E para pirarucu. Para os peixes criados em sistema de tanques-rede, os resultados dos tratamentos C800 e C+E apresentaram valores significativamente maiores (p<0,05) para Ht, [Hb], RBC, MCHC comparados aos tratamentos controle e 500 mg α-T kg^{-1} (Figura 5). Todos os parâmetros hematológicos analisados (Ht, [Hb], RBC e MCV) nos peixes alimentados com ração suplementada com α-tocoferol foram similares àqueles do controle, com exceção de MCHC.

Estudos sobre a suplementação de Vitamina C+E na dieta de *Salmo salar* (Hamre et al., 1997) e *Notemigonus crysoleucas* (Chen et al., 2004) demonstraram que não existe interação destas vitaminas nos índices eritrocitários. Os resultados deste estudo (Figura 5) corroboram estes da literatura.

A identificação e a contagem de trombócitos, linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos de pirarucu submetidos a diferentes tratamentos por 45 dias são apresentados na Tabela 8. As características morfológicas destas células, foram similares entre todos os indivíduos alimentados com rações suplementadas com vitamina C, E e C+E e os do controle, e similares àquelas descritas para *A. gigas*, por Tavares-Dias et al. (2007a).

Os leucócitos (WBC) são importantes indicadores do mecanismo de defesa em peixe, e a função anti-oxidante das vitaminas C e E, fornecem proteção para a função leucocitária (Cuesta et al., 2002; Sahoo & Mukherjee, 2002). No presente estudo, os valores de WBC dos indivíduos dos tratamentos C800 e C+E foram significativamente maiores (p<0,05) quando comparados àqueles do controle e do tratamento E500 (Tabela 8). Esses resultados corroboram os descritos para esta espécie em condições laboratoriais, evidenciando a função da vitamina C na resistência imunológica dos pirarucus.

No presente estudo, o número de trombócitos foi significativamente menor (p<0,05) em pirarucus suplementados com vitamina E na alimentação se comparado aos do controle, mas não foram diferentes daqueles alimentados com vitaminas C e C+E. Os indivíduos do tratamento C800 apresentaram número de trombócitos significativamente maiores (p<0,05) em relação ao controle. A interação C+E não apresentou diferenças comparadas aos demais tratamentos. Os linfócitos foram os leucócitos mais abundantes no pirarucu, cujos valores foram significativamente menores (p<0,05) nos tratamentos com vitaminas E e C em relação ao controle e àqueles suplementados com vitaminas C+E. As demais células, monócitos, neutrófilos e eosinófilos, não apresentaram diferenças entre os tratamentos.

Em pirarucus, apenas os tratamentos com vitamina C (C500, C800 e C1200) apresentaram aumento significativo (p<0,05) no número de leucócitos totais em relação ao controle (Tabela 8). Esses resultados confirmam a capacidade dessa vitamina em aumentar a resistência imunológica do pirarucu, a exemplo do que tem sido relatado para outras espécies de peixes (Verlhac et al., 1996; Cuesta et al., 2002; Sahoo & Mukherjee, 2002; Pearce et al., 2003; Chen et al., 2004; Lin & Shiau, 2005). Por outro lado, alguns estudos sugerem que altas doses de vitamina E

resultam em efeitos imunológicos indesejáveis como, por exemplo, a diminuição do WBC (Puangkaew et al., 2004), indicando uma maior vulnerabilidade a doenças. No presente estudo, as altas concentrações de vitamina E não influenciaram no número de leucócitos do pirarucu, mas uma variação qualitativa dessas células poderia fornecer alguns efeitos benéficos para esta espécie em situações de estresse.
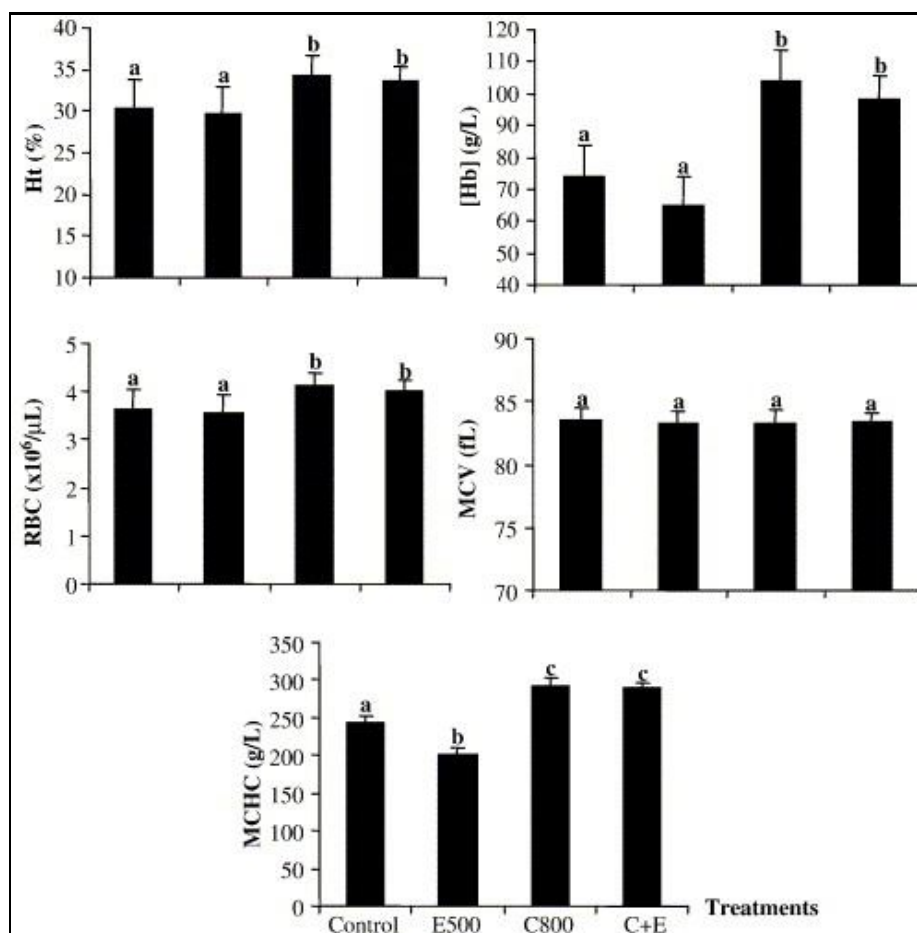
Figura 5. Hematócrito (Ht), número de eritrócitos (RBC), concentração de hemoglobina ([Hb]), volume corpuscular médio (MCV), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) de *A. gigas* alimentado com dietas experimentais por 45 dias. Controle = ração comercial; C800 = 800 mg AA kg^{-1}; E500 = 500 mg α-T kg^{-1} e C+E = 800 mg AA kg^{-1} + 500 mg α-T kg^{-1}. Média ± D.P. Diferentes letras significam diferenças significativas (teste de Tukey, $p<0,05$).

Tabela 8. Contagem de trombócitos e leucócitos de pirarucus *A. gigas* alimentados com diferentes dietas por 45 dias. Valore expressam média ± desvio padrão.

Parâmetros	Tratamentos			
	Controle	E500	C800	C+E
Trombócitos (µL)	12553,3±1559,0a	6603,3±648,8bd	19212,9±1829,9cd	6096,7±4279,9ad
WBC (µL)	13445,3±1226,5a	13611,1±1460,7a	15833,3±1150,4b	15500,0±923,5b
Linfócitos(µL)	12968,9±1237,6a	11559,4±1284,3b	10568,1±3008,^{9b}	12668,9±1502,3a
Neutrófilos (µL)	1864,4±959,9a	1529,4±554,9a	2211,8±1062,1a	2419,4±1297,6 a
Monócitos (µL)	624,4±316,3a	802,2±425,5a	739,7±725,0a	748,9±462,1a
Eosinófilos (µL)	8,9±13,7a	15,6±14,5b	25,0±27,1b	116,1±35,5b

Controle = ração comercial (350 mg AA kg^{-1}); C800 = 800 mg AA kg^{-1}; E500 = 500 mg α-T kg^{-1}; C+E = 800 mg AA +500 mg α-T kg^{-1}. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p<0,05$).

Embora seja descrito na literatura que a vitamina C interage com a vitamina E para estimular o sistema imune dos peixes (Cuesta et al., 2002; Ortuño et al., 2001, 2003; Chen et al., 2004), os resultados dos indicadores imunológicos avaliados, no presente estudo, não demonstraram um efeito sinergístico das vitaminas C+E no perfil leucocitário de pirarucus cultivados em tanques-rede. Isto sugere que as alterações detectadas nos peixes desse tratamento foram respostas induzidas apenas pela elevada dose de vitamina C.

Os valores de proteínas totais de pirarucus foram significativamente maiores ($p<0,05$) nos tratamentos C800 e C+E comparados aos do controle e do E500 (Figura 6). Esses resultados foram diferentes daqueles obtidos em condições laboratoriais, cujos valores de proteínas totais foram elevados nos tratamentos com vitaminas C e E. Provavelmente, tais diferenças estejam relacionadas a fatores ambientais decorrentes dos sistemas testados (tanques de PVC e tanques-rede).

As concentrações de glicose plasmática para os tratamentos com vitamina E confirmam os resultados obtidos para esta espécie em condições laboratoriais, cujos valores foram significativamente (Figura 6) elevados ($p<0,05$) em relação ao controle e altas doses de vitamina C. Além disso, observa-se um efeito sinergístico na interação vitamina C+E na produção de glicose. Não é possível afirmar, nesse caso, se a hiperglicemia é ou não uma vantagem para a manutenção do animal.

Portanto, esses resultados indicam que aquelas rações com níveis elevados de vitaminas C contribuíram para a síntese de proteínas plasmáticas, melhorando a capacidade de transporte de O_2 e tornando a

resposta imune mais eficiente em pirarucu criados em tanques-rede. Por outro lado, superdoses de vitamina E para esta espécie, não melhoroa seu perfil fisiológico. Supõe-se que a interação das vitaminas C e E não apresentou nenhum efeito sinérgico nos índices eritrocíticos ou no sistema imune do pirarucu.
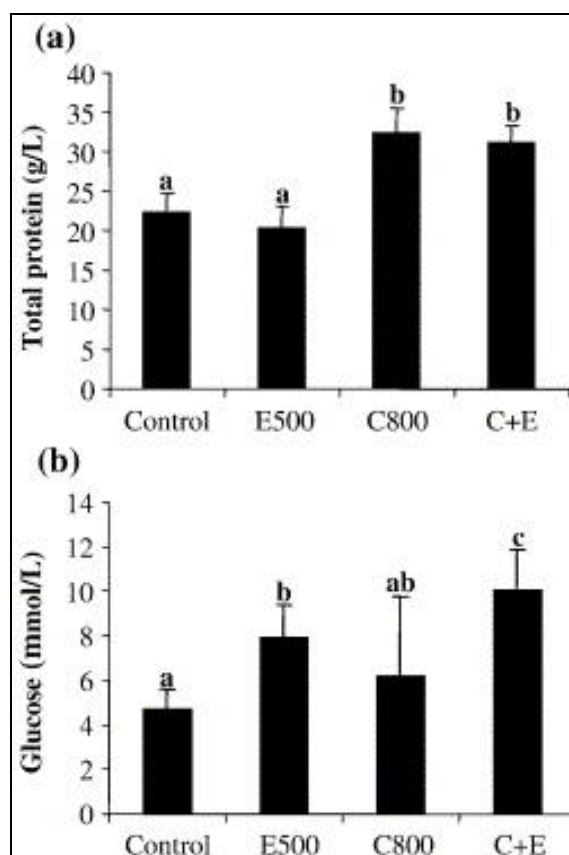
Figura 6. Proteína total (a) e glicose plasmática (b) de *A. gigas* submetidos a diferentes tratamentos por 45 dias. Controle = ração comercial; C800 = 800 mg AA kg^{-1}; E500 = 500 mg α-T kg^{-1} e C+E = 800 mg AA kg^{-1} + 500 mg α-T kg^{-1}. Media ± D.P., n = 18. Diferentes letras significam diferenças significativas (teste de Tukey, $p<0,05$).

Aspectos citoquímicos de trombócitos e leucócitos em juvenis de pirarucu

Espécimes de *A. gigas* (59,8 ± 2,5 cm e 1730,0 ± 270,0 g) com seis meses de idade obtidos do CPAQ/INPA tiveram o sangue coletado para confecção de extensões sanguíneas submetidas à coloração pancrômica (com May Grünwald-Giemsa-Wright) e citoquímica para identificação de metacromasia, glicogênio (PAS), peroxidase e esterase inespecífica (Tavares-Dias, 2006a), lipídios (Sudan black B) e proteínas gerais (azul de bromofenol).

No sangue de *A. gigas* foram encontrados trombócitos, linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos. Os trombócitos são células que podem ser arredondadas ou fusiformes, apresentando citoplasma de coloração hialina, acompanhando o formato da célula (Figura 7A). O citoplasma dos trombócitos apresentou grânulos de glicogênio (Tabela 9 e Figura 8A) e sudanofilia.

Os linfócitos são células que podem apresentar tamanhos variados, possuem citoplasma basofílico, grande relação núcleo-citoplasma e projeções citoplasmáticas (Figuras 7A-B). Estas células não apresentaram nenhuma positividade às colorações citoquímicas usadas.

Os monócitos são células geralmente arredondadas, maiores que os linfócitos, com citoplasma basofílico contendo ou não vacúolos (Figura 7B), e foram corados fracamente com PAS e azul de bromofenol (Tabela 9).

Os neutrófilos são células arredondadas e o núcleo pode ser em forma de bastonete ou segmentada. O citoplasma contém finos grânulos neutrofílicos (Figura 7C) que apresentam glicogênio, lipídios e proteínas gerais (Tabela 9 e Figuras 8B-D).

Os eosinófilos são células geralmente arredondadas e menores que os neutrófilos, com citoplasma contendo grânulos grosseiros e de cor alaranjada e o seu núcleo pode ser em forma de bastonete ou segmentada (Figura 7D). Os grânulos destes granulócitos mostraram reação positiva para glicogênio, proteínas gerais e lipídeos, além de fraca reação para peroxidase (Tabela 9 e Figuras 8E-H). Nenhum basófilo foi encontrado nas extensões sanguíneas coradas com o corante clássico tipo Romanowsky (corante hematológico de rotina) ou após coloração com azul de toluidina, para identificação de reação metacromática.

Tabela 9. Colorações citoquímicas em trombócitos e leucócitos de pirarucu *A. gigas*.

	Trombócitos	Linfócitos	Monócitos	Neutrófilos	Eosinófilos
PAS	++	–	+	++	++
Peroxidase	–	–	–	–	+
Azul de Bromofenol	–	–	+	++	++
Sudan Black	_	–	–	++	++
Azul de Toluidina	++	–	–	–	–

++: Reação Positiva; +: Reação Fraca; -: Reação Negativa.
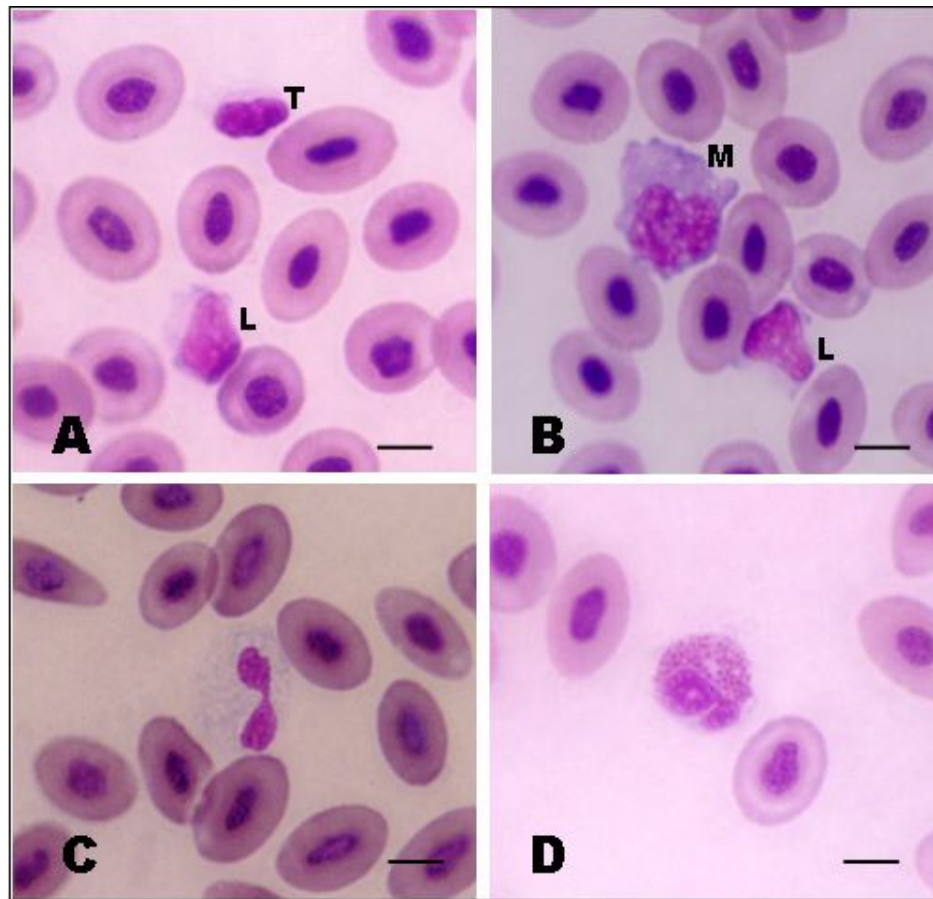
Figura 7. Células sanguíneas de *A. gigas* coradas com May Grünwald-Giemsa-Wright. (**A**) Linfócitos (L) e trombócito (T), (**B**) monócito (M) e linfócito (L), (**C**) neutrófilo e (**D**) eosinófilo. Barra= 5,0 µm. Tavares-Dias et al. (2007a).
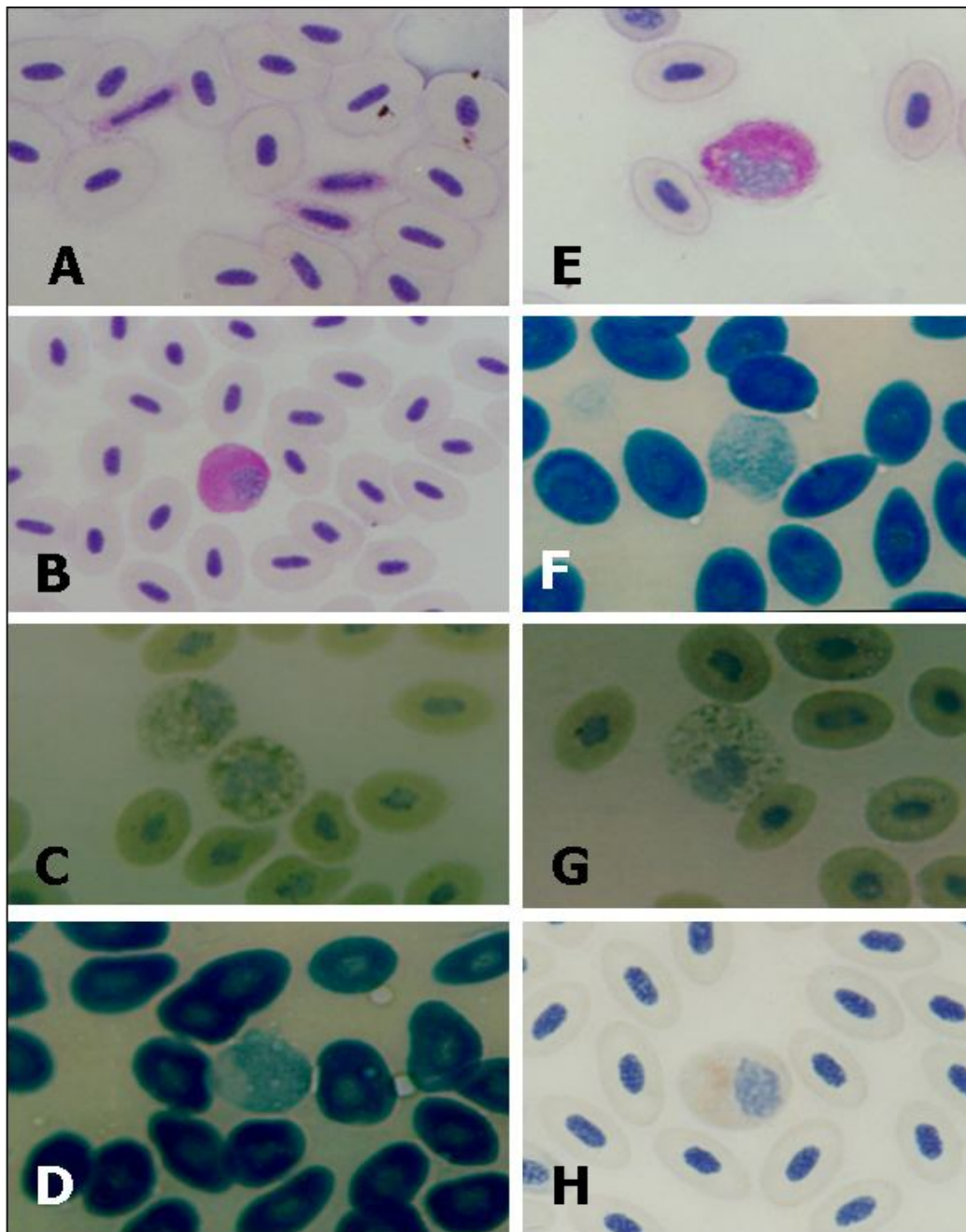
Figura 9. Colorações citoquímicas em trombócitos e leucócitos de *A. gigas*. Trombócitos corados com PAS (**A**). Neutrófilos corados com PAS (**B**), Sudan black B (**C**) e azul de bromofenol (**D**). Eosinófilos corados com PAS (**E**), azul de bromofenol (**F**), Sudan black B (**G**) e peroxidase (**H**). Barra =5,0 µm.

As proteínas básicas presentes nas granulações dos leucócitos têm função de defesa contra micro-organismos, provocando a morte destes quando são liberadas, após a ruptura destas células (Lorenzi, 1999). Para demonstração da presença de proteínas gerais nos leucócitos pode ser usados métodos de coloração com azul de bromofenol. Este método citoquímico possibilitou a identificação de proteínas gerais em eosinófilos e neutrófilos de *A. gigas*, mostrando também o mesmo resultado para eosinófilos e neutrófilos *Salminus brasiliensis* (Veiga et al., 2000), bem como para eosinófilos de *Oreochromis niloticus* (Ueda et al., 2001).

A peroxidase é uma importante enzima lisossômica que participa na digestão intracelular, modula a atividade fagocítica e atua no sistema microbicida intracelular envolvendo reações de oxidação (Mesenguer et al., 1994; Ueda et al., 2001; Tavares-Dias & Barcellos, 2005; Tavares-Dias, 2006a; Tavares-Dias & Moraes, 2006b). Portanto, desempenha importante função na resposta imunológica nata dos peixes teleósteos (Tavares-Dias, 2006a). A peroxidase eosinofílica é uma enzima característica dos grânulos secundários ou específicos dos eosinófilos (Lorenzi, 1999) e influencia dois eventos durante o processo inflamatório - a marginação dos neutrófilos e sua acumulação no local lesado. Porém, a ausência de peroxidase em algumas espécies de peixes parece estar acompanhada pelo desenvolvimento compensatório de outros componentes microbicidas, como por exemplo, as proteínas catiônicas.

As esterases são enzimas relacionadas aos mecanismos de defesa celular, principalmente à fagocitose (Tavares-Dias & Barcellos, 2005; Tavares-Dias, 2006a). Esterases como alfa-naftil acetato esterase ácida podem ser usadas para distinguir linfócitos T dos linfócitos B em peixes, uma vez que população B é negativa e população T positiva (Blaxhall & Dogget, 1987). Porém, em *Maccullochella peeli peeli* esterases inespecíficas foram sensíveis, mas não foram específicas, uma vez que reação positiva ocorreu em monócitos, linfócitos, heterófilos e basófilos (Shigdar et al., 2009).

O glicogênio é fonte energética importante e nos leucócitos maduros localizam-se nos glicossomas (Hayhoe & Quaglino, 1994; Lorenzi, 1999). Para localização de glicogênio e glicoproteínas nas células sanguíneas e em outros tecidos, pode ser usado o método do ácido periódico de Schiff/PAS (Tavares-Dias, 2006a; Tavares-Dias & Moraes, 2006b; Shigdar et al., 2009). Dentre os carboidratos, os mais importantes para os fagócitos são os polissacarídeos, principalmente, o glicogênio, que se acumula com a maturação celular. Por exemplo, em trutas *Oncorhynchus mykiss*, os neutrófilos apresentaram coloração PAS-positiva durante a fagocitose, ao contrário dos neutrófilos que não estavam participando do processo (Lamas et al., 1994). Esta presença de glicogênio nas células fagocíticas está associada ao fornecimento de energia necessária para a realização da fagocitose (Veiga et al., 2000; Ueda et al., 2001; Tavares-Dias, 2006a; Tavares-Dias & Moraes, 2006b; Shigdar et al., 2009).

Os lipídios correspondem a uma parte do peso dos leucócitos, mas as células maduras possuem maior quantidade (Lorenzi, 1999) e podem ser corados com Sudan Black B. Os neutrófilos podem utilizar os lipídios do citoplasma como fonte de energia e, além disso, estas células podem degradar lipídios, por atuação das enzimas citoplasmáticas (Lorenzi, 1999). Assim, a sudanofilia nesses granulócitos, revela a presença de grande

quantidade de lipídios. Em eosinófilos, esta reação sudanofílica pode estar relacionada também à presença de substâncias como a proteína básica maior ou proteína catiônica eosinofílica (Ueda et al., 2001).

Parâmetros sanguíneos de pirarucus em cultivo semi-intensivo

Espécimes de pirarucu *A. gigas*, de um a 26 meses de idade, com comprimento total (Comp.) variando de 10,0 a 62,0 cm e peso de 5,9 a 70,7g (Tabela 10) foram coletados em piscicultura do município de Manacapuru (AM, Brasil), para análises hematológicas. Os peixes provenientes de desovas naturais na piscicultura foram previamente treinados para receber ração balanceada para carnívoros. A partir de plâncton produzido na própria piscicultura, via processo de adubação, os alevinos foram alimentados, inicialmente, com esse plâncton até atingirem 10 cm de comprimento. A partir desse comprimento, até atingirem 20 cm, foram alimentados com plâncton e ração moída (45% PB), para condicionamento da alimentação artificial. A partir deste comprimento passaram a ser alimentados a cada duas horas, com peixe triturado e ração artificial, elaborada em forma de uma massa pastosa, utilizando apenas o filé de peixes Curimatidae (Branquinha) e Hemiodontidae (Charuto).

Os níveis plasmáticos de glicose e cloreto de *A. gigas* mostraram variações com a idade (Tabela 10). Porém, somente os níveis de proteínas (Proteínas totais) plasmáticas seguem um padrão de variação, pois nos peixes com idade entre dois e cinco meses ocorreram os valores médios menores, quando comparados aos peixes com idade entre 24 e 36 meses. Houve correlação positiva, de baixa magnitude, mas altamente significativa ($p<0,001$) entre os níveis de proteínas plasmáticas e o comprimento padrão [Proteínas totais= 1,789 + (0,0295 x comprimento)] (Figura 10), indicando incremento proporcional dos níveis de proteínas com o crescimento em tamanho dessa espécie de peixe.

Tabela 10. Parâmetros bioquímicos de pirarucus *A. gigas* em diferentes idades. Valores expressam as médias ± desvio padrão.

Idade	Comp. (cm)	Proteína (g/dL)	Glicose (mg/L)	Sódio (mmol/L)	Potássio (mmol/L)	Cloreto (mmol/L)
1 mês (n=25)	10,7±0,5	-	76,2±42,3	-	-	48,5±13,5
2 meses (n=30)	16,7± 1,2	1,7±0,2	123,2±40,3	141,9±8,0	2,1±0,4	40,9±10,1
3 meses (n=45)	17,8 ± 2,6	2,4±0,8	94,8±27,4	139,4±7,7	3,2±1,2	41,4±14,6
4 meses (n=27)	21,5 ± 3,4	2,1±0,6	102,6±41,1	139,0±9,3	4,2±1,1	47,5±17,3
5 meses (n=40)	23,2 ± 3,3	2,7±0,8	89,1±35,8	145,4±7,4	2,7±0,6	60,6±19,6
6 meses (n=29)	28,7 ± 6,9	2,9±0,4	110,7±41,5	141,8±7,9	2,9±0,8	54,3±6,6
9 meses (n=23)	35,5 ± 1,8	3,9±0,6	93,7±19,6	144,6±6,4	3,3±0,8	63,8±21,1
11 meses (n=03)	58,7 ± 3,2	3,2±0,1	89,1±12,5	146,3±6,7	2,6±0,4	60,0±10,1
12 meses (n=28)	45,6 ±7,7	3,5±0,7	98,4±25,8	140,8±7,6	3,2±0,8	40,3±9,7
15 meses (n=07)	46,9 ± 4,0	2,6±0,7	93,2±44,0	140,3±6,4	2,5±0,8	48,4±13,0
18 meses (n=09)	50,8 ± 3,1	3,5±0,7	96,6±20,0	141,9±8,7	2,3±0,4	45,4±7,4
21 meses (n=05)	71,4 ± 7,7	3,2±0,6	98,6±12,2	137,4±19,8	3,2±0,5	45,2±12,3
24 meses (n=03)	38,0 ± 2,6	4,4±0,4	115,0±19,9	139,0±14,9	2,0±0,4	54,7±6,2
36 meses (n=02)	55,5 ± 9,2	3,8±0,4	108,1±8,3	142,0±8,5	2,6±0,4	57,0±1,4
TOTAL (n=276)	---	2,7±0,9	97,3±35,8	141,7±8,3	2,9±1,0	49,1±16,0
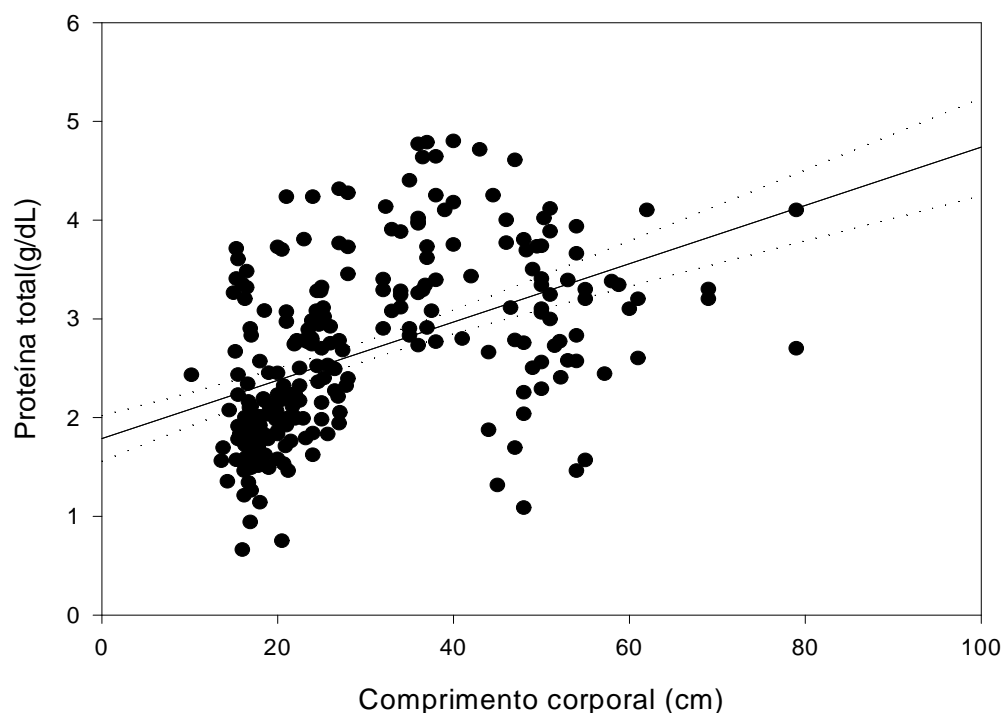
Figura 10. Correlação entre os níveis de proteínas totais e comprimento padrão (r=0,486; p>0,001) em *A. gigas* (n=246) de cultivo semi-intensivo.

Os parâmetros eritrocitários de *A. gigas* apresentaram pouca variação com o aumento da idade. Porém, os menores valores de CHCM ocorreram em peixes maiores, os quais são mais velhos (Tabela 11). Consequentemente, correlação negativa de baixa magnitude, mas altamente significativa (p<0,01), foi observada entre o CHCM e comprimento padrão [CHCM = 33,647 - (0,143 x comprimento total)] (Figura 11), indicando uma redução do CHCM com o incremento em tamanho dos peixes.

Os demais parâmetros sanguíneos não evidenciaram correlações significativas (p>0,05). Porém, os peixes com 12, 15 e 18 meses de idade apresentaram menor crescimento corporal se comparados aos peixes de 11 meses. Possivelmente, isso deve ter interferido nos estudos de correlação e, consequentemente, dificultando a análise dos demais parâmetros sanguíneos estudados.

Tabela 11. Parâmetros eritrocitários de pirarucus *A. gigas* em diferentes idades. Valores expressam as médias ± desvio padrão.

Idade	Eritrócitos ($x\ 10^6/\mu L$)	Hct (%)	Hb (g/dL)	VCM (fL)	CHCM (g/dL)
1 mês (n=25)	1,430±0,64	29,1±11,5	4,4±1,8	167,8±46,7	18,5±4,3
2 meses (n=27)	2,443± 0,67	36,4±4,2	12,1±2,1	164,2±74,29	34,3±4,4
3 meses (n=45)	1,831±0,53	30,1±5,8	9,7±2,5	182,7±78,5	33,1±9,6
4 meses (n=30)	2,196±0,42	30,5±5,2	9,8±2,2	141,1±23,3	32,3±5,4
5 meses (n=40)	1,804±0,23	31,6±5,6	8,9±2,0	189,7±65,7	27,7±5,6
6 meses (n=29)	1,916±0,37	31,8±7,3	9,9±1,6	166,8±30,7	32,6±11,2
9 meses (n=23)	1,854±0,22	35,6±1,9	9,2±0,9	194,5±26,4	25,8±3,0
11 meses (n=03)	1,620±0,19	33,0±1,0	9,1±0,6	206,3±32,3	27,7±1,0
12 meses (n=28)	1,881±0,53	31,4±4,3	8,8±2,1	179,6±60,9	27,7±3,8
15 meses (n=07)	1,973±0,29	37,4±2,4	8,6±0,8	192,5±27,5	23,1±1,7
18 meses (n=09)	1,469±0,26	31,9±4,0	8,1±1,6	220,9±35,2	25,4±3,7
21 meses (n=05)	2,058±0,34	33,6±2,5	8,1±0,7	166,9±29,8	24,2±1,9
24 meses (n=03)	1,877±0,32	34,3±0,6	9,2±0,6	186,6±32,1	26,8±2,1
36 meses (n=02)	2,025±0,43	32,0±0,0	9,0±0,3	161,7±34,4	28,1±0,9
TOTAL (n=276)	1,962±0,52	31,5±6,8	9,3±2,4	172,6±58,6	29,9±7,8

Hct: Hematócrito; Hb: Hemoglobina; VCM:Volume Corpuscular Médio; CHCM:Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
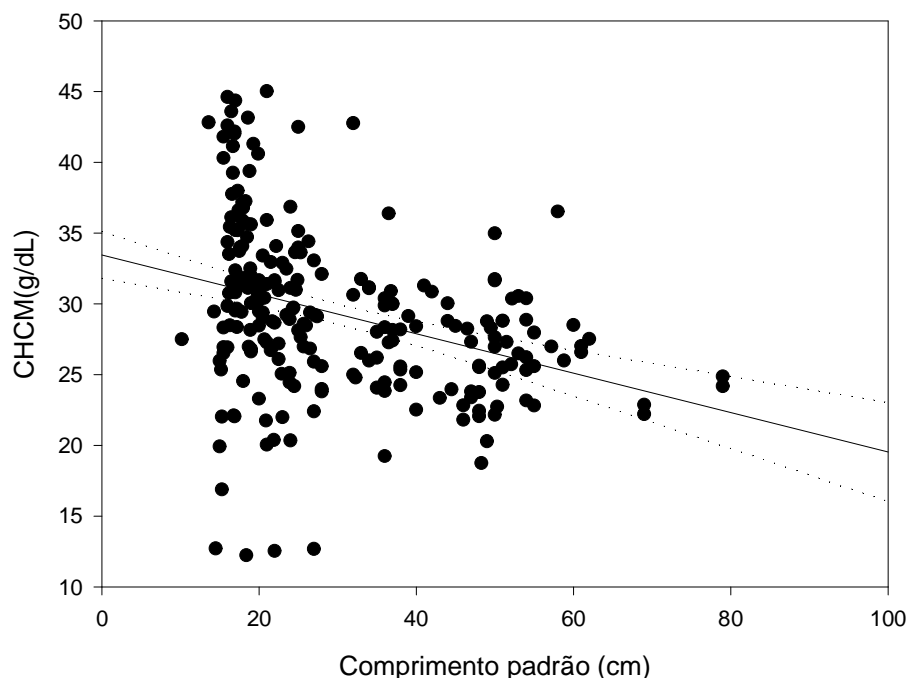
Figura 11. Correlação entre o CHCM e o comprimento padrão (r=0,358; p>0,01) em *A. gigas* (n=235) de cultivo semi-intensivo.

Durante trabalho de campo, principalmente na Amazônia, e em pisciculturas, nem sempre é possível realizar rapidamente a contagem de eritrócitos e a determinação da hemoglobina. Assim, pelo estabelecimento das correlações entre a contagem de eritrócitos e a hemoglobina e entre elas e o hematócrito, que é mais simples e mais rápido de se determinar, poderia ser estimado o número de eritrócitos e a concentração de hemoglobina. Na maioria das vezes o valor do coeficiente angular (*r*) é relativamente elevado, mas outras vezes esse coeficiente é baixo ou relativamente baixo.

Em *A. gigas*, foi observado correlação positiva, altamente significativa ($p<0,001$) da concentração de hemoglobina com o hematócrito [Hb=4,168 +(0,160 x Hct] (Figura 12) e com o número de eritrócitos [Hb=5,734 +(1886x RBC)] (Figura 13). Este mesmo tipo de correlação ocorreu entre o hematócrito e o número de eritrócitos [Hct = 23,971 + (3,908 x RBC)] (Figura 14). Esses resultados indicam um incremento proporcional entre esses três parâmetros eritrocitários, a exemplo do que ocorre em outras espécies de teleósteos. Contudo, biologicamente, têm sido considerados válidos somente os coeficientes angulares próximos ou superiores a 0,500 (Ranzani-Paiva, 1991; 1995).
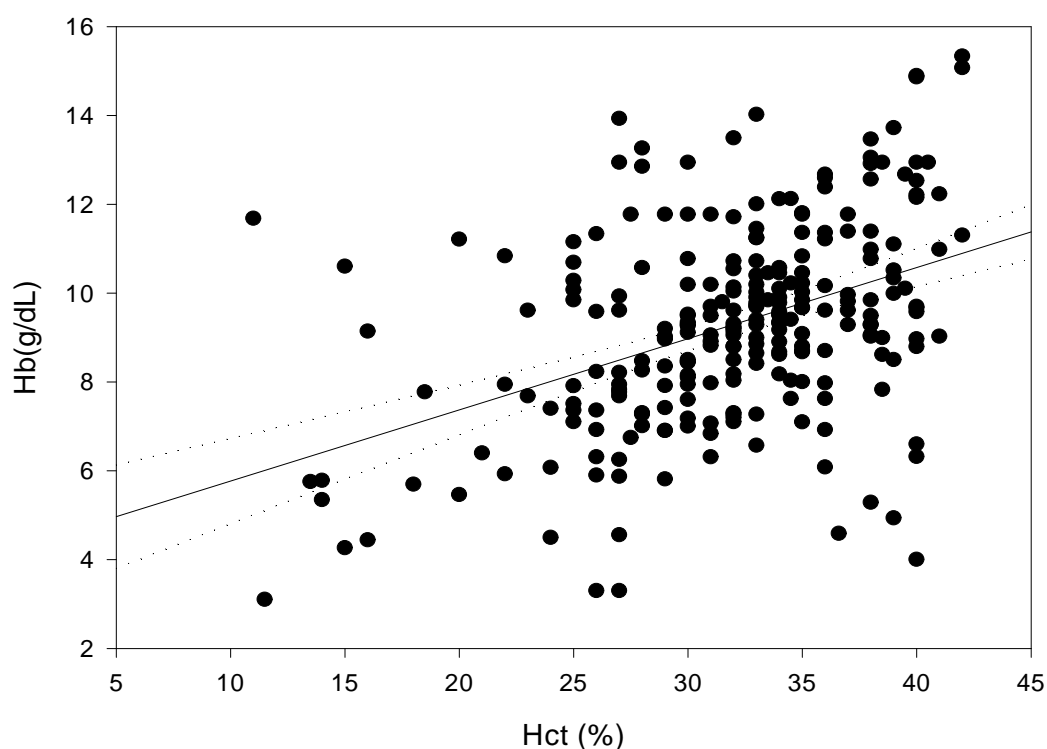
Figura 12. Correlação entre o hematócrito e a concentração de hemoglobina ($r=0,431$; $p>0,001$) em *A. gigas* (n=251) de cultivo semi-intensivo.
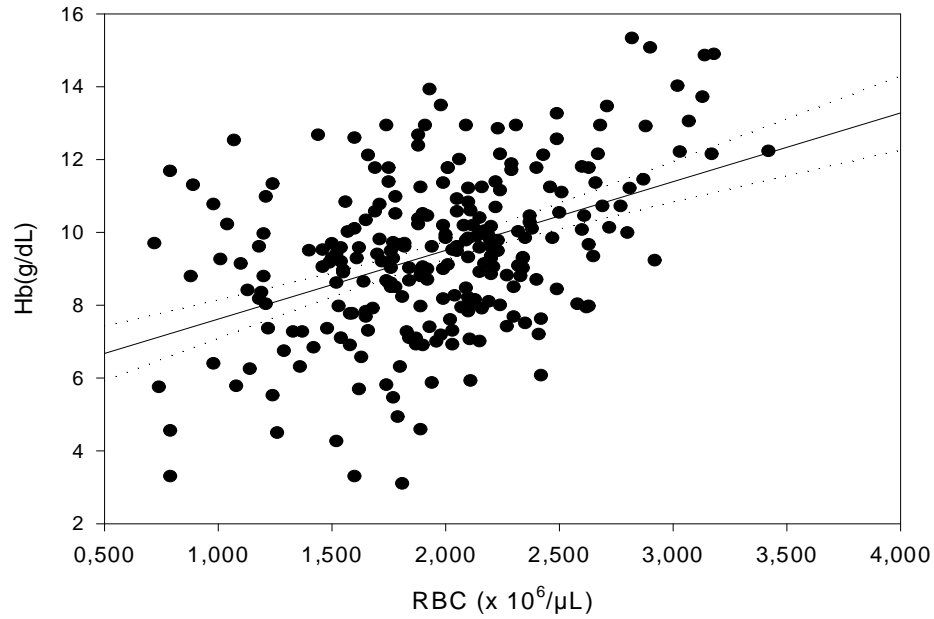
Figura 13. Correlação entre o número de eritrócitos totais (RBC) e a concentração de hemoglobina (r=0,447; p>0,001) em *A. gigas* (n=253) de cultivo semi-intensivo.
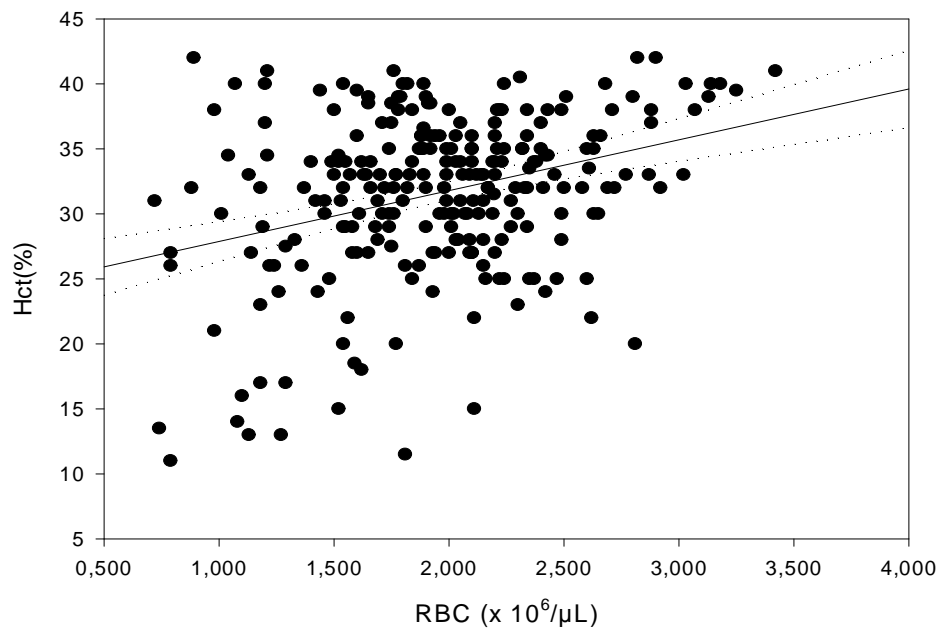
Figura 14. Relação entre o número de eritrócitos totais e o hematócrito (r=0,332; p>0,001) em *A. gigas* (n=252) de cultivo semi-intensivo.

As contagens de trombócitos e leucócitos em *A. gigas* apresentaram pouca variação em relação à idade. Porém, os peixes com idade entre um e quatro meses mostraram elevado número de leucócitos. As contagens de eosinófilos variaram em peixes de diferentes idades, mas não houve um padrão definido nesta variação (Tabelas 12 e 113).

A idade é um dos fatores responsáveis por interferências nos parâmetros sanguíneos dos peixes. Em *A. gigas*, somente os níveis plasmáticos de proteínas totais e o CHCM mostram alterações que podem ser consideradas relevantes. Porém, esses peixes eram provenientes de diferentes desovas naturais ocorridas na piscicultura e isso pode ter interferido nos parâmetros sanguíneos estudados, causando as variações observadas. Porém, em esturjões *Acipenser percicus* e *Huso huso*, o hematócrito e percentual de linfócitos aumentaram com a idade dos peixes, enquanto o de neutrófilos diminuíram (Bahmani et al., 2001). Em híbrido de *Morone chrysops* x *M. saxatilis*, houve aumento dos níveis de proteínas totais, hematócrito, hemoglobina, VCM e do número de eritrócitos com o aumento da idade, mas redução dos níveis de glicose. Além disso, o número de leucócitos nestes peixes mais jovens foi maior, diminuindo com o avanço da idade, enquanto o número de linfócitos e de trombócitos aumentou (Hrubec et al., 2001). Em carpas *C. carpio* o hematócrito e os níveis de hemoglobina aumentaram durante o primeiro ano de vida (Svetina et al., 2002), quando o metabolismo dos peixes é maior, devido ao seu crescimento corporal. Assim, alterações nos parâmetros sanguíneos podem ser esperadas, devido ao crescimento dos tecidos hematopoiéticos (rim e baço), os quais continuam se desenvolvendo nos peixes jovens até a idade adulta.

Tabela 12. Trombócitos e leucócitos de pirarucus *A. gigas* em diferentes idades. Valores expressam as médias ± desvio padrão.

Idade	Trombócitos (µL)	Leucócitos (µL)	Linfócitos (µL)	Monócitos (µL)	Neutrófilos (µL)	Eosinófilos (µL)
1 mês (n=16)	9985 ± 3902	16678 ± 7256	12989 ± 5069	248 ± 172	276 ± 202	3088 ± 2023
2 meses (n=23)	16288 ± 15550	16094 ± 6331	12208 ± 6142	252 ± 238	618 ± 594	1728 ± 1260
3 meses (n=45)	9967 ± 10364	15157 ± 7665	11422 ± 5880	601 ± 988	787 ± 737	2487 ± 1832
4 meses (n=30)	11799 ± 2439	14900 ± 2750	11021 ± 2313	485 ± 368	1070 ± 687	2363 ± 945
5 meses (n=40)	9867 ± 2024	12572 ± 3102	9299 ± 2234	434 ± 338	869 ± 760	2047 ± 1054
6 meses (n=29)	8324 ± 1041	13191 ± 2395	9704 ± 1815	436 ± 343	875 ± 515	2131 ± 993
9 meses (n=23)	10904 ± 2799	10055 ± 3646	7557 ± 2393	346 ± 259	713 ± 514	1439 ± 824
11 meses (n=03)	8767 ± 1804	9859 ± 892	8430 ± 1570	300 ± 219	553 ± 601	575 ± 316
12 meses (n=28)	10114 ± 2980	13738 ± 3017	10116 ± 2001	532 ± 364	1010 ± 662	2071 ± 1021
15 meses (n=07)	10633 ± 1647	13557 ± 1885	10427 ± 1984	529 ± 341	833 ± 404	1769 ± 560
18 meses (n=09)	13864 ± 5088	12598 ± 5158	9467 ± 3969	520 ± 466	774 ± 385	1655 ± 1107
21 meses (n=05)	11113 ± 1904	14107 ± 2178	10023 ± 1263	516 ± 376	963 ± 548	2606 ± 922
24 meses (n=03)	12352 ± 1802	11074 ± 2109	8685 ± 1446	448 ± 425	644 ± 133	1298 ± 352
36 meses (n=02)	10122 ± 1728	10750 ± 1768	8448 ± 2139	500 ± 368	550 ± 240	1253 ± 244
TOTAL (n=263)	10863±6911	13660±3812	10238±3843	460±515	834±654	2062 ± 1240

Tabela 13. Contagem relativa de leucócitos de pirarucus *A. gigas* em diferentes idades. Valores expressam as médias ± desvio padrão.

Idade	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Neutrófilos (%)	Eosinófilos (%)
1 mês (n=16)	77,6 ± 4,4	3,2 ± 1,1	3,3 ± 0,8	16,9 ± 4,3
2 meses (n=29)	82,5 ± 5,0	2,1 ± 1,7	3,8 ± 2,5	11,6 ± 4,2
3 meses (n=45)	75,8 ± 8,1	3,0 ± 2,2	4,9 ± 3,5	16,4 ± 6,9
4 meses (n=30)	74,0 ± 7,1	3,3 ± 2,4	7,3 ± 4,1	15,7 ± 5,0
5 meses (n=40)	74,5 ± 6,7	3,5 ± 2,5	6,8 ± 4,9	15,8 ± 5,8
6 meses (n=29)	74,0 ± 7,2	3,3 ± 7,2	6,6 ± 3,6	15,7 ± 6,1
9 meses (n=23)	76,3 ± 5,5	3,2 ± 1,9	6,8 ± 2,9	13,7 ± 3,1
11 meses (n=03)	85,0 ± 8,7	3,0 ± 2,0	6,0 ± 6,9	6,0 ± 3,5
12 meses (n=28)	74,4 ± 7,2	3,9 ± 2,5	7,0 ± 3,6	14,6 ± 5,1
15 meses (n=07)	75,1 ± 6,1	4,0 ± 2,7	6,1 ± 3,0	13,3 ± 4,8
18 meses (n=09)	75,2 ± 5,8	3,9 ± 2,7	7,7 ± 5,0	13,2 ± 5,7
21 meses (n=05)	71,4 ± 3,9	4,0 ± 3,2	6,6 ± 3,3	18,0 ± 4,0
24 meses (n=03)	78,7 ± 2,3	3,7 ± 3,1	6,0 ± 1,7	11,7 ± 1,5
36 meses (n=02)	78,0 ± 7,1	5,0 ± 4,2	5,0 ± 1,2	12,0 ± 4,2
TOTAL (n=269)	75,8 ± 7,1	3,3 ± 2,4	5,9 ± 2,9	15,2 ± 5,8

Considerações finais

Em todas as fases do seu desenvolvimento o pirarucu está susceptível ao parasitismo, mas o período da alevinagem é o mais crítico, uma vez que nessa fase de vida o sistema imune, em desenvolvimento, apresenta pouca capacidade de resposta às ações dos parasitos, normalmente presentes no ambiente aquático. Os elevados níveis de infecções por Monogenoidea e *Trichodina* sp. são preocupantes, uma vez que esses parasitos tem causado mortalidade de pirarucus cultivados no estado do Amazonas. Esses níveis elevados de parasitismo estão relacionados, principalmente, à ausência de manejo ictiossanitário na piscicultura e às práticas de manejo inadequadas. Assim, faz-se necessário adotar medidas de profilaxia e monitoramento sanitário nas piscigranjas, bem como o diagnóstico da situação epidemiológica em outros estabelecimentos de cultivo do Amazonas. Substâncias químicas podem ser usadas no controle parasitário, porém essas podem causar resistência nos parasitos, danos aos peixes tratados e poluição ambiental (Garcia et al., 2009). Portanto, na piscicultura, além de investigar as espécies de parasitos causando as doenças no peixe, é imprescindível identificar as causas para atuar corretamente no tratamento, mas sem interferir na qualidade do pescado ou contaminar o meio ambiente.

Para o pirarucu *A. gigas*, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos são as principais células de defesa imunológica, uma vez que estes perfazem a maioria dos leucócitos do sangue circulante deste peixe. Além disso, linfócitos responderam com aumento às infecções causadas por Monogenoidea, e os

neutrófilos e eosinófilos apresentaram em seus grânulos substâncias citoquímicas importante para defesa imunológica, tais como a presença de glicogênio, proteínas gerais e lipídios.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao projeto “Sanidade e ictiopatologia do pirarucu (*Arapaima gigas*) cultivado na Amazônia: qualidade da água e estresse ambiental – SANICT”- (Processo: 557108/2005-5) e pela bolsa PQ concedida a M. Tavares-Dias (Processo: 300472/2008-0).

Referências

AFFONSO, E. G.; SILVA, E. C.; TAVARES-DIAS, M.; MENEZES, G. C.; CARVALHO, C. S.; NUNES, E. S. S.; ITUASSÚ, D. R.; ROUBACH, R.; ONO, E. K.; FIM, J. D. I.; MARCON, J. L. 2007. Effect of high levels of dietary vitamin C on the blood responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 147A:383–388.

ANDRADE, J. I. A.; ONO, E. A.; MENEZES, G. C.; BRASIL, E. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E. G. 2007. Influence of diets supplemented with vitamin C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. *Comp. Bioch. Physiol.*, 146A:576-580.

ARAÚJO, C. S. O.; GOMES, A. L.; TAVARES-DIAS, M.; ANDRADE, S. M. S.; BELEM-COSTA, A.; BORGES, J. T.; QUEIROZ, M. N.; BARBOSA, M. 2009. Parasitic infections in pirarucu fry, *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) kept in a semi-intensive fish farm in Central Amazon, Brazil. *Vet Arhiv*. (In Press).

AZEVEDO, T. M. P.; MARTINS, M. L.; BOZZO, F. R.; MORAES, F. R. 2006. Haematological and gills response in parasitized tilapia from valley of Tijucas River, SC, Brazil. *Scientia Agr.*, 63:115-120.

BAHMANI, M.; KAZEMI, R.; DONSKAYA, P. 2001. A comparative study of some hematological features in young reared sturgeons (*Acipenser persicus* and *Huso huso*). *Fish Physiol. Biochem.*, 24:135-140.

BARTON, B. A. 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.*, 42:517-525.

BAYLIS, H. A. 1927. Some parasitic worms from *Arapaima gigas* (teleostean fish) with a description of *Philometra senticosa* n. sp. (Filarioidea). *Parasitology*, 19:35-47.

BELO, M. A. A.; SCHALCH, S. H. C.; MORAES, F. R.; SOARES, V. E.; OTOBONI, A. M. M. B.; MORAES, J. E. R. 2005. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish (*Piaractus mesopotamicus*). *J. Comp. Pathol.*, 133:146–154.

BLAXHALL, P. C.; DOGGET, T. 1987. Esterases and phosphatases in the leucocytes of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 30:35-40.

BRANDÃO, F.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C. 2006. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amazonica*, 36:349–356.

BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ, J. M.; SHOSTAK, W. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al*. revisited. *J. Parasitol.,* 83:575-583.

CAVERO, B. A. S.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R.; ITUASSÚ, D. R.; GANDRA, A. L.; CRESCÊNCIO, R. 2003. Biomassa sustentável de juvenis de pirarucu em tanques-rede de pequeno volume. *Pesq. Agrop. Brasil*., 38:723-728.

CHAGAS, E. C.; VAL, A. L. 2003. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. *Pesq. Agrop. Bras.*, 38: 397–402.

CHEN, R.; LOCHMANN, R.; GOODWIN, A.; PRAVEEN, K.; DABROWSKI, K.; LEE, K.-J. 2004. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, haematology, tissue composition; vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). *Aquaculture*, 242:553–569.

CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. 2002. Natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.) and its modulation by vitamin C. *Fish Shellfish Immunol*., 13:97–109.

DOGGET, T. A.; WRATHMELL, A. B.; HARRIS, J. E. 1987. A cytochemical and ligth microscopical study of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*, Cichlidae. *J. Fish. Biol*., 31:147-153.

FEIJÓ, M. M.; ARANA, S.; CICCARELLI, P. S.; ADRIANO, E. A. 2008. Light and scaning electron microscopy of Henneguya arapaima n.sp. (Myxozoa: Myxobolidae) and histologia of infected sites in pirarucu (*Arapaima gigas*: Pisces: Arapaimidae) from the Araguaia river, Brazil. *Vet. Parasitol*., 157:59-64.

GARCIA, F.; FUJIMOTO, R. Y.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. 2009. Protozoan parasites of *Xiphophorus* spp. (Poeciliidae) and their relation with water characteristics. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 61:156-162.

GHIRALDELLI, L.; MARTINS, L. M.; YAMASHITA, M. M.; JERONIMO, G. T. 2006. Ectoparasites on the Haematological parameters of Nile tilapia and carp culture in the state of Santa Catarina South Brazil. *J. Fish. Aquat. Sci.*, 270-276.

GOMES, A. L.; SANTOS, M. S.; COSTA, A. B.; CORREA, M. V.; VARELLA, A. B. 2006. Riqueza de helmintos parasitos do estômago de pirarucu *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) coletados na reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Tefé, Amazonas (Brasil). In: IV Congresso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA2006 (www.civa2006.org): 891-895.

HAMRE, K.; WAAGBO, R.; BERGE, R. K.; LIE, O. 1997. Vitamins C and E interct in juvenils Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). Free Radical Biol. Med., 22: 137-149, 1997.

HAYHOE, F. G. J.; QUAGLINO, D. 1994. *Haematological Cytochemistry*. London: Churchill Livingstone.

HENRIQUE, M. M. F.; GOMES, E. F.; GOUILLOU-COUSTANS, M. F.; OLIVA-TELES, A.; DAVIES, S. J. 1998. Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream; *Sparus aurata. Aquaculture*, 161:415–426.

HRUBEC, T. C.; SMITH, S. A.; ROBERTSON, J. L. 2001. Age-related changes in hematology and plasma chemystry values of hybrid striped bass (*Morone Chrysops* x *More saxatatilis)*. *Vet. Clin.Pathol*., 30:8-15.

IMBIRIBA, E. P. 2001. Potencial de criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. *Acta Amazonica*, 31:299-316.

KÖLLNER, B.; FISCHER, U.; ROMBOUT, J. H. W. M.; TAVERNE-THIELE, J. J.; HANSEN, J. D. 2004. Potential involvement of rainbow trout thrombocytes in immune functions: a study using a panel of monoclonal antibodies and RT-PCR. Dev. *Comp. Immunol.*, 28:1049–1062.

KRITSKY, D. C; BOEGER, A.; THATCHER, V. E. 1985. Neotropical Monogenea. 7. Parasites of the pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829) with descriptions of two news species and redescription of *Dawestrema cycloancistrium* Price and Nowlin, 1967 (Dactylogyridae: Ancyrocephalinae). *Proc. Biol. Soc. Washington*, 98:321-331.

LAMAS, J.; SANTOS, Y.; BRUNO, D. W.; TORANZO,A. E.; ANADÓN, R. 1994. Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its e intracellular products (ECPs). *J. Fish Biol*., 45(5): 839-854.

LIN, M. F.; SHIAU, S. Y. 2005. Requirements of vitamin C (L-ascorbyl-2-sulphate and L-ascorbyl-2-polyphosphate) and its effects on non-specific immune responses of grouper (*Epinephelus malabaricus*). *Aquac. Nutr.*, 11:183–189.

LORENZI, T. F. 1999. Manual de hematologia propedêutica e clínica. São Paulo: MDSI.

MALTA, J. C. O. 1982. Os argulídeos (Crustacea: Branchiura) da Amazônia brasileira. Aspectos de ecologia de *Dolops discoidalis* Bouvier, 1899 e *Dolops bidentata* Bouvier, 1899. *Acta Amazonica,* 12:521-528.

MARTINS, M. L.; GHIRALDELLI, L. 2008. *Trichodina magna* Van As and Basson, 1989 (Ciliophora: Peritrichia) from cultured Nile tilapia in the state of Santa Catarina, Brazil. *Braz. J. Biol.* 68:177-180.

MENEZES, G. C.; TAVARES-DIAS, M.; ONO, E. A.; ANDRADE, J. I. A.; BRASIL, E. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E. G. 2006. The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. *Comp. Biochem. Physiol.*, 145A:274-279.

MONTERO, D.; TORT, L.; ROBAINA, L.; VERGARA, J. M.;IZQUIERDO, M. S. 2001. Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. Fish & Shellfish Immunol, 11:473-490.

ONO, E. A. 2005. Cultivar Peixes na Amazônia: Possibilidade ou Utopia? *Panorama da Aquicultura*, 15: 41-48.

ONO, E. A.; HALVERSON, M. R.; KUBITZA, F. 2004. Pirarucu – O gigante esquecido. *Panorama da Aquicultura*, 14: 14-25.

ONO, E. A.; KUBITZA, F. 2003. Cultivo de peixes em tanques-rede. 3. ed. Jundaí: Ono, E.A.

ONO, E. A.; ROUBACH, R.; PEREIRA, M. F. 2003. Pirarucu Production – Advances in Central Amazon, Brazil. *Global Aquac. Advoc.*, 6:44-46.

ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. 2001. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (Sparus aurata L.) innate immune system. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 79:167–180.

ORTUÑO, J.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER. 2003. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 14:145–156.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. 2008. *Doenças de Peixes: Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento*. 3. ed. Maringá: Eduem.

PAVAVELLI, G. C.; MACHADO, M. H.; TAKEMOTO, R. M.; GUIDELLI, G. M.; LIZAMA, M. A. P. 2004. Helminth fauna of fishes: Diversity and ecological aspects. In: THOMAZ, S. M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (Ed.). *The upper Paraná River and its floodplain: Physical aspects, ecology and conservation*. Leiden, Netherlands: Blackhuys Publishers, p. 309-329.

PEARCE, J.; HARRIS, J. E.; DAVIES, S. J. 2003.The effect of vitamin E on the serum complement activity of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquacul. Nutr.*, 9:337-340.

PUANGKAEW, J.; KIRON, V.; SOMAMOTO, T.; OKAMOTO, N.; SATOH, S.; TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. 2004. Non-specific immune response of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin Eand highly unsaturated fatty acids. *Fish Shellfish Immunol.*, 16:25–39.

RANZANI-PAIVA, M. J. T. 1991. Características sangüíneas da pirapitinga do sul, *Brycon* sp., sob condições experimentais de criação intensiva. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 28:141-153.

RANZANI-PAIVA, M. J. 1995. Características hematológicas de tainha *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunar de Cananéia-SP. (Lat. 25°00’ S - Long. 47°55’W). *B. Inst. Pesca*, 22:1-22.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ISHIKAWA, C. M.; PORTELA, M. C.; CELIBERTO, R. J. 1987. Hematologia da carpa, *Cyprinus carpio*, infestada por *Argulus* sp e após um tratamento com fosfonato de 0,0-dimetil-oxi-2,2,2, tricloretilo (Neguvon). *B. Inst. Pesca*, 14:83-92.

RANZANI-PAIVA, M. J.; ISHIKAWA, C. M.; CAMPOS, B. E. S.; EIRAS, A. C. 1997. Haematological characteristics associated with parasitism in mullets, *Mugil platanus* Günther, from the estuarine region of Cananéia, São Paulo, Brazil. *Revta Brasil. Zool*, 14:329-339.

ROHDE, K.; HAYWARD, C.; HEAP, M. 1995. Aspects of the ecology of metazoan ectoparasites of marine fishes. *Int. J. Parasitol*, 25:945-970.

ROUGH, K. M.; NOWAK, B. F.; REUTERS, R. E. 2005. Haematology and leukocyte morphology of wild caught *Thunnus maccoyii*. *J. Fish Biol.*, 66:1649–1659.

RUANE, N. M.; NOLAN, D. T.; ROTLLANT, J.; TORT, L.; BALM, P. H. M.; WENDELAAR BONGA, S.E. 1999. Modulation of the response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to confinement, by an ectoparasitic (*Argulus foliaceus* L.) infestation and cortisol feeding. *Fish Physiol. Biochem.*, 20, 43-51.

SAHOO, P. K.; MUKHERJEE, S. C. 2002. Influence of fish dietary α-tocopherol intakes on specific immune response; non-specific immune resistance factors and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquac. Nutr.*, 8:159–167.

SANTOS, C. P.; MORAVEC, F.; ROSSANA VENTURIERI, R. 2008. *Capillostrongyloides arapaimae* sp. n. (Nematoda: Capillariidae), a new

intestinal parasite of the arapaima *Arapaima gigas* from the Brazilian Amazon. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 103:392-395.

SANTOS, S. M. C. dos; CECCARELLI, P. S.; LUQUE, J. L. 2008. Helmintos parasitos do pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) Osteoglossiformes:Arapaimidae), no rio Araguaia, estado de Mato Grosso, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol*. Vet., 17(3):171-173.

SHIGDAR, S.; HARFORD, A.; ALISTER, C.; WARD, A. C. 2009. Cytochemical characterisation of the leucocytes and thrombocytes from Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*, Mitchell). *Fish & Shellfish Immunology*, In Press.

SILVA-SOUZA, A. T.; ALMEIDA, S. C.; MACHADO, P. M. 2000. Effect of the infestation by *Lernaea cyprinacea* Linnaeus, 1758 (Copedoda, Lernaeidae) on the leucocytes of *Schizodon intermedius* Garavello & Britski, 1990 (Osteichthyes: Anostomidae). *Rev. Brasil. Biol.*, 60:217-220.

SIMVOKÁ, A.; DESDEVISES, Y.; GELNAR, M.; MORAND, S. 2000. Co-existence of nine gill ectoparasites (Dactylogurus: Monogenea) parasiting the roach (*Rutilus rutilus* L.): history and present ecology. *Int. J. Parasitol*., 30:1077-1088.

SUBASINGHE, R.; SOTO, D.; J.I.A, J. 2009. Global aquaculture and its role in sustainable development. *Reviews Aquacul*., 1:1-9.

SVETINA, A.; MATASIN, Z.; TOFANT, A.; VUCEMILO, M.; FIJAN, N. 2002. Haematological and some blood chemical parameters of young carp till the age of three years. *Acta Vet. Hung*., 50:459-467.

TAVARES-DIAS, M. 2006a. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. *J. Fish Biol*., 69:1822-1833.

TAVARES-DIAS, M. 2006b. Cytochemical method for staining fish basophils. *J. Fish Biol.*, 69:312-317.

TAVARES-DIAS, M.; BARCELLOS, J. F. M. 2005. Peripheral blood cells of the armored catfish *Hoplosternum littorale* Hancock, 1828: a morphological and cytochemistry study. *Braz. J. Morph. Sci.*, 22:215-220.

TAVARES-DIAS, M.; BARCELLOS, J. F. M.; MARCON, J. L.; MENEZES, G. C.; ONO, E. A.; AFFONSO, E. G. 2007a. Hematological and biochemical parameters for the pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Osteoglossiformes, Arapaimatidae) in net cage culture. *Elect. J. Ichthyol*., 2:61-68.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; KRONKA, S. N. 1999a. Evaluation of the haematological parameters in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) with *Argulus* sp. (Crustacea: Branchiura) infestation and treatment with organophosphate. *Revta Brasil. Zool.*, 16:553-555.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S. H. C.; MARTINS, M. L.; SILVA, E. D.; MORAES, F. R.; PERECIN, D. 1999b. Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitária. I. Variáveis do *Leporinus macrocephalus* Garavelo e Britski, 1988 (Anostomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887(Characidae). *Acta Scientiarum*, 21:337-342.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2004. *Hematologia de Peixes Teleósteos*. 1. ed. Ribeirão Preto: Villimpress.

TAVARES-DIAS, M; MORAES, F. R. 2006a. Hematological parameters for the *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Osteichthyes, Characidae) intensively bred. *Hidrobiologica,* 16: 271-274.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2006b. Morphological, cytochemical, and ultrastructural study of thrombocytes and leukocytes in neotropical fish, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Characidae, Byconinae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol,* 38:209-215.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2007. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. *Vet. Clin. Pathol*., 36:49-54.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R.; ONAKA, E. M.; REZENDE, P. C. B. 2007b. Changes in blood parameters of hybrid tambacu fish parasitized by *Dolops carvalhoi* (Crustacea, Branchiura), a fish louse. *Vet Arhiv*, 77: 355-363.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. 2008. Hematological assessment in four Brazilian teleost fish with parasitic infections, collected in feefishing from Franca, São Paulo, Brazil. *B. Inst. Pesca*, 24: 96-101.

THATCHER, V. E. 1980. Duas novas espécies de *Caballerotrema* (Trematoda: Echinostomatidae) do pirarucu e do aruanã (Osteoglossidae), com uma redefinição do gênero e uma redescrição de *C. brasiliense* Prudhoe, 1960. *Acta Amazonica*, 10: 419-423.

THATCHER, V. E. 1991. Amazon fish parasites. *Amazoniana*, 11: 263-572.

THATCHER, V. E. 2006. *Amazon fish parasites*. Sofia:Pensoft Publishers.

TORT, L.; ROTLLANT, J.; LIARTE, C.; ACERETE, L.; HERNANDEZ, A.; CEULEMANS, S.; COUTTEAU, P.; PADROS, F.; 2004. Effects of temperature decrease on feeding rates, immune indicators and histopathological changes of gilthead sea bream *Sparus aurata* fed with an experimental diet. *Aquaculture*, 229, 55–65.

TRAVASSOS, L.; ARTIGAS, P.; PEREIRA, C. 1928. Fauna helmintológica dos peixes de água doce do Brasil. *Arq. Inst. Biol*., 1:5-82.

UEDA, I. K.; EGAMI, M. I.; SASSO, W. S.; MATUSHIMA, E. R. 2001. Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis* (*Tilapia*) *niloticus* (Linnaeus, 1758) Cichlidae, Teleostei) – Part II. *Braz. J. vet. anim. Sci*., 38:273-277.

VEIGA, M. L.; EGAMI, M. I.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; RODRIGUES, E. L. 2000. Aspectos morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas de *Salminus maxilosus* Valenciennes, 1840 (Characiformes, Characidae). *Rev. Chil. Anat*., 18:245-250.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.; OBACH, A.; SCHÜEP, W.; HOLE, R. 1996. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 143: 123–133.

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 17

Parasitos do matrinxã *Brycon amazonicus* Spix & Agassiz, 1829 (Characidae: Bryconinae) na Amazônia central

José Celso de Oliveira Malta, Sanny Maria Sampaio Andrade, Sandro Loris Aquino-Pereira, Marcos Tavares-Dias & Angela Maria Bezerra Varella

Resumo
Neste capítulo descrevem-se os parasitos de matrinxã Brycon amazonicus cultivado em diferentes modalidades na Amazônia Central. Estudos demonstram que com a intensificação do cultivo deste peixe os problemas com as infecções parasitárias também podem mostrar incremento, devido às condições sanitárias, transporte e manejo inadequados. O transporte de peixes é uma maneira rápida de propagação de doenças, quando os cuidados com profilaxia e quarentena não são mantidos na piscigranja. Nestes estabelecimentos de cultivo, os estudos de parasitofauna podem auxiliar no controle e proliferação dos parasitos, evitando assim perdas econômicas significativas para o produtor.

Abstract
In this chapter, are reported the parasites of matrinxã Brycon amazonicus kept in different culture modalities in the Amazonian central. Studies demonstrated that due to increment of the culture of this fish the problems with the parasitic infections also have been increasing. Low sanitary conditions, fish transport and inadequate handling are factors causing these infections. The transport of fish is a fast way of diseases spread, if the management of prophylaxis and quarantine are not maintained in the fish farm. In fish farm, the parasitofauna studies can aid in the control and proliferation of the parasites, avoiding significant economical losses to producer.

Introdução

Em populações naturais de seres vivos os parasitos estão sempre presentes, formando normalmente um complexo equilíbrio dinâmico com as comunidades de vida livre. Em geral, os peixes são o ápice da cadeia alimentar nos ambientes de água doce, por isso tendem a ser parasitados por uma grande quantidade de espécies.

As enfermidades na piscicultura, começam a tornar-se um problema mais freqüente à medida que se intensificam os sistemas de criação. Como os peixes são os vertebrados mais parasitados, quando submetidos a manejos inadequados, a homeostase que existia entre o hospedeiro e sua fauna parasitária é quebrada, surgindo então as epizootias, que geralmente levam os peixes à morte em pouco tempo (Malta et al., 2001).

As espécies de peixes do gênero *Brycon* têm passado por freqüentes estudos, porém o conhecimento da taxonomia do grupo ainda é limitado (Lima, 2001). As seguintes espécies de peixes: *Chalceus amazonicus* Agassiz, 1829; *C. carpophagus* Valenciennes, 1850; *Brycon longiceps* Steindachner, 1877; *B. siebenthalae* Eigenmann, 1912 e *B. pellegrini* Holly, 1929, foram consideradas sinonímias de *B. amazonicus* Spix & Agassiz, 1829 (Lima 2001; 2003).

Brycon cephalus Günther, 1869 (Figura 1) sinônimo de *B. erythropterum* Cope, 1872 ainda é uma espécie válida, mas sua distribuição geográfica é restrita à região do alto Rio Amazonas, sendo encontrado principalmente na Bolívia e no Peru. Os exemplares que foram anteriormente citados na região da Amazônia central foram identificados erroneamente, e serão considerados como *B. amazonicus.* Todas as citações de parasitos para aquelas espécies serão consideradas como parasitos de *B. amazonicus*.

Figura 1. Espécime de *Brycon amazonicus* cultivado em canal de igarapé do Tarumã-Mirim, Manaus (AM).

Parasitos de matrinxãs em ambiente natural

Foram encontrados na Amazônia parasitando os filamentos branquiais de *B. amazonicus*, coletados na natureza o Ciliophora *Trichodina* sp. (Andrade et al., 2001), os Monogenoidea *Anacanthorus elegans* Kritsky, Thatcher & Kayton, 1979; *A. kruidenieri* Kritsky, Thatcher & Kayton, 1979; *A. spiralocirrus* Kritsky, Thatcher & Kayton, 1979; *Jainus amazonensis* Kritsky, Thatcher & Kayton, 1980; *Tereancistrum kerri* Kritsky, Thatcher & Kayton, 1980; *T. ornatus* Kritsky, Thatcher & Kayton, 1980 e *Trinibaculum brazilensis* Kritsky, Thatcher & Kayton, 1980 (Thatcher, 1991; 2006).

Também parasitando as brânquias de matrinxã foram citados os copépodos *Amplexibranchius bryconis* Thatcher & Paredes, 1985; *Ergasilus bryconis* Thatcher, 1981 e nas fossas nasais o *Gamidactylus bryconis* Varella, 1994 (Malta & Varella, 1998; Varella, 1994). Na cavidade bucal foi encontrado o Isopoda *Braga* sp. (Pizango-Paima, 1997).

No trato digestivo de *B. amazonicus* os cecos pilóricos estavam parasitados por Nematodas: *Spirocamallanus inopinatus* Travassos, 1929 (Thatcher, 1991; 2006; Pizango-Paima, 1997), *Cucullanus* sp. e *Rabdochona* sp. (Pizango-Paima, 1997). Na superfície do corpo e pele foi encontrado o Monogenoidea *A. brevis* Mizelle & Kritsky, 1969 (Travassos, 1929; Thatcher, 1991; 2006).

A pele de matrinxãs coletados no Rio Negro estava parasitada por Branchiura, *Argulus chicomendesi* Malta & Varella, 2000 e *Dipteropeltis hirundo* Calman, 1912 (Malta & Varella, 2001). Essa espécie também foi encontrada parasitando matrinxãs coletados no igarapé do Acará, na Reserva Ducke (Malta & Varella, 2006).

De 136 juvenis de *B. amazonicus* coletados no lago Catalão (margem direita do Rio Negro, próximo à ilha de Marchantaria no Rio Solimões) 49 exemplares (36,0%) estavam parasitados por metacercárias de Digenea, *Dendrorchis* sp., provavelmente trata-se da espécie *Dendrorchis neiva* Travassos, 1926; nos cecos pilóricos, mesentério e intestino; 32 (23,5%) por Nematoda no intestino; 26 (19,1%) por Monogenoidea, *J. amazonensis*, nas brânquias; 3 (2,2%) por Ciliophora *Trichodina* sp. nas brânquias; 2 (1,47%) por estágios larvais de Cestoda da ordem Proteocephalidea nos cecos pilóricos e intestino e 1 (0,73%) por Acanthocephala, *Echinorhynchus* sp. no intestino (Tabela 1) (Andrade et al., 2001).

Os juvenis de *B. amazonicus* em condições naturais apresentaram elevada carga parasitária por *J. amazonensis* (Figura 2A) acompanhada de intensa produção de muco e presença de metacercárias nos cecos pilóricos e intestino, mas nenhuma patogenia foi observada. Além disso, *Trichodina* sp. foi encontrada nas brânquias (Figura 2B). Mesmo sendo muito jovens, com 0,8-5,0 cm de comprimento, estavam parasitados por nematóides adultos, indicando que foram infectados a partir do momento que começaram a alimentar-se de zooplâncton (Tabela 2) (Andrade, 2000; Andrade et al., 2001).
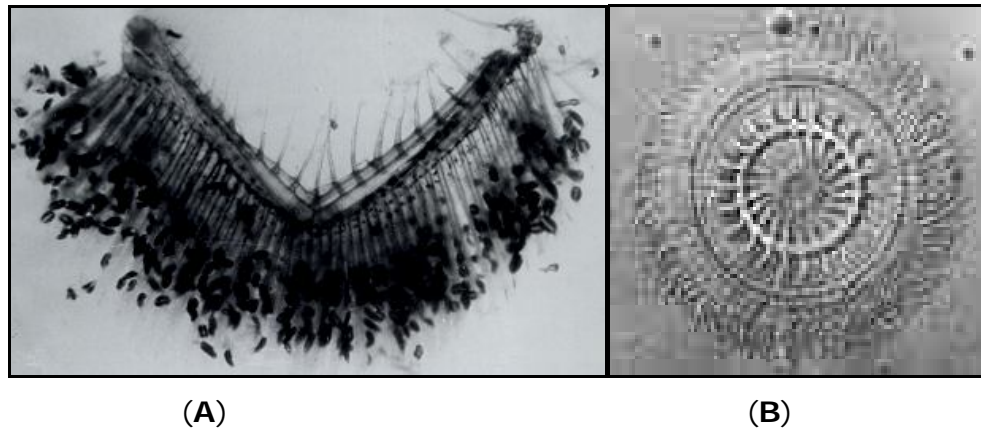
Figura 2. (A) Brânquia de alevino de matrinxã, capturado na natureza, com severa infecção por *Jainus amazonensis* (Monogenea: Dactylogyridae); **B**) protozoário ciliado *Trichodina* sp. (Ciliophora) encontrado no raspado branquial. Andrade et al.(2001).

Tabela 1. Locais de fixação dos parasitos de alevinos de *B. amazonicus* coletados no lago Catalão e Rio Solimões próximo à ilha da Marchantaria, estado do Amazonas (Andrade, 2000).

Classes	Parasitos	Local de fixação
Ciliophora	*Trichodina* sp.	Filamentos branquiais
Monogenoidea	*Jainus amazonensis*	Filamentos branquiais
Nematoda	*Spirocamallanus inopinatus*	Porção anterior e média do intestino
Digenea	Metacercárias	Cecos pilóricos, mesentério, intestino
Cestoda	Larvas plerocercóides	Cecos pilóricos, mesentério, intestino
Acantocephala	*Echinorhynchus* sp.	Porção anterior do intestino

Tabela 2. Índices parasitários de alevinos de *B. amazonicus* coletados no lago Catalão e rio Solimões próximo à ilha da Marchantaria, Estado do Amazonas (Andrade, 2000).

Classes	Espécie de parasito	P(%)	Intens.	Intens. média (±EP)	Abund. média ±EP)
Monogenoidea	*Jainus amazonensis*	19,1	2-2679	342,42 (± 130,43)	65,46 (± 27,1)
Nematoda	*Spirocamallanus inopinatus*	23,52	1-3	1,25 (± 0,08)	0,294 (± 0,05)
Trematoda	Metacercárias	36,02	1-25	5,36 (± 0,74)	1,93 (± 0,34)
Cestoda	Larvas plerocercóides	1,47	30-110	70 (± 24,76)	1,02 (± 0,83)
Acanthocephala	*Echinorhynchus* sp.	0,73	1	1	0,007
Protozoa	*Trichodina* sp.	2,2	10-20	13,33 (± 1,5)	0,294 (± 0,17)

P:Prevalência; Intens.: intensidade; Abund.:Abundância; EP: erro padrão.

Parasitos de larvas e juvenis de matrinxãs de estação de piscicultura

Foram necropsiados 167 exemplares de matrinxã, *B. amazonicus*, sendo 55 no estágio de larvas e 112 juvenis obtidos em uma estação de piscicultura no município do Rio Preto da Eva, no Estado do Amazonas. Os peixes examinados estavam parasitados por Monogenoidea (Plathyhelminthes) e por Nematoda (Hanada, 2003).

Três juvenis, com 15 dias de vida estavam parasitados pelo Monogenoidea *A. elegans*. Nos dois primeiros peixes *A. elegans* parasitava os olhos. O primeiro peixe pesava 0,67g, media 39,6mm e estava parasitado por três monogenóideos. O segundo pesava 0,39g, media 32,6mm e estava parasitado por dois. No terceiro peixe, três exemplares de *A. elegans* parasitavam as fossas nasais. A prevalência foi de 1,8% e a intensidade variou de 2-3 indivíduos por hospedeiro (Hanada, 2003).

Os intestinos de 19 juvenis estavam parasitados por Nematoda. O local de maior ocorrência foi a porção anterior do intestino com 57,9% de prevalência e o menor os cecos pilóricos com 47,4%. Os nematódeos são da superfamília Trichuroidea e família Trichuridae. A prevalência de Nematoda foi de 11,4% e a intensidade variou de 1-12 parasita por peixe. O início do parasitismo ocorreu a partir do 8º dia de vida desses juvenis (Hanada, 2003).

Parasitos de juvenis de matrinxãs coletados na natureza e criados em tanques de piscicultura

Juvenis de matrinxã coletados no lago Catalão, na margem direita do Rio Negro, e no Rio Solimões próximo à ilha da Marchantaria foram mantidos em tanques de alvenaria, com fundo de terra em uma estação de piscicultura em Manaus. 30 dias após a aclimatação, foram coletados 60 espécimes para a necropsia (Andrade, 2000).

Destes 60 espécimes de *B. amazonicus* 70,0% (42) estavam parasitados pelo monogenóideo *J. amazonensis*, 23,0% (14) pelo nematóide *S. inopinatus*, 15,0% (9) por metacercárias de trematódeos e 3,0% (2) pelo acantocéfalo *Echinorhynchus* sp. A espécie que apresentou os maiores índices parasitários foi *J. amazonensis* (Tabela 3)(Andrade, 2000; Andrade et al., 2001).

Neste capítulo, a nomenclatura dos índices parasitários (prevalência, intensidade média, variação de intensidade, abundância média) usados para avaliação do nível de infecção foi a recomenda por Bush et al. (1997).

Tabela 3. Índices parasitários de alevinos de *B.amazonicus* coletados em tanques de criação de uma piscicultura em Manaus, estado do Amazonas (Andrade, 2000).

Espécies	P (%)	Intensidade	IM ± EP	AM (±EP)
J. amazonensis	70,0	1-2400	222,4 ± 90,16	115,7 ± 64,77
S. inopinatus	23,3	1-2	1,1 ± 0,09	0,2 ± 0,06
Metacercária	15,0	2-25	7,6 ± 1,86	1,1 ± 0,5
Echinorhynchus sp.	3,3	1-2	1,5 ± 0,48	0,05 ± 0,03

EP: Erro padrão; P:Prevalência; IM: Intensidade média; AM: Abundância média.

Dos 60 espécimes de *B. amazonicus* foram coletados amostras de sangue de 15 peixes, e após análise, todas apresentaram resultados negativas para hemoparasitos. Os exames macroscópicos nos alevinos de matrinxã provenientes da estação de piscicultura não revelaram a ocorrência de nenhum sinal clínico (Andrade, 2000; Andrade et al., 2001).

Ocorreu variação na composição da fauna parasitológica e nos índices de infestação nos peixes provenientes de condições naturais, e também naqueles examinados após 30 dias em tanques na estação de piscicultura de Manaus. Os espécimes de condições naturais estavam parasitados por seis grupos de parasitas e aqueles dos tanques por quatro. Os dois grupos que não ocorreram em *B. amazonicus* dos tanques foram Ciliophora (*Trichodina* sp.) e Cestoda (Andrade, 2000).

A fauna de monogenóideos dos peixes provenientes dos tanques de criação, após 30 dias de coletados, foi a mesma encontrada na natureza, uma única espécie, *J. amazonensis*. Este parasita apresentou maior prevalência e abundância média nos tanques de criação e maior índice de intensidade média na natureza (Andrade, 2000).

Nos peixes mantidos por 30 dias nos tanques da estação foi encontrada a mesma espécie de nematóide dos peixes em condições naturais, *S. inopinatus.* Os índices parasitários foram similares em ambos (Andrade, 2000).

Os acantocéfalos (*Echinorhynchus* sp.) mostraram aumento da prevalência nos peixes dos tanques de criação comparados aos do ambiente natural. A permanência de 30 dias dos alevinos de matrinxãs em tanques de criação foi suficiente para incrementar o número de espécimes parasitos, assim como os índices parasitários. Por isso, a obrigatoriedade de um período de quarentena para esta espécie antes de serem incorporados aos plantéis de criações (Andrade, 2000).

Ciclo de vida completo do *Ergasilus bryconis* (Copepoda), parasito de matrinxãs em piscicultura

Varella (1985) descreveu o desenvolvimento larval completo de *Ergasilus bryconis*, parasito das brânquias do matrinxã *Brycon amazonicus (=erythropterum).* Também foi descrito o primeiro macho do gênero *Ergasilus* da América do Sul, presente no plâncton dos tanques de uma estação de piscicultura de Manaus.

O número médio de ovos por fêmea de *Ergasilus bryconis* foi de 46, variando desde um mínimo de 28 em um exemplar com comprimento de cefalotórax igual a 330 µm a um número máximo de 67 em uma fêmea com comprimento do cefalotórax igual a 307 µm (Varella, 1985).

Os índices parasitários e o número de *Ergasilus bryconis* parasitando *B. amazonicus* coletados na natureza, no igarapé do Tarumã-Açú, afluente da margem esquerda do Rio Negro, foram menores que os dos peixes coletados na estação de piscicultura de Manaus (Tabela 4) (Varella, 1985).

Tabela 4. Prevalência, intensidade média e densidade relativa de *Ergasilus bryconis* parasitas de matrinxãs *B. azonicus* do Igarapé do Tarumã-Açú e da estação de piscicultura de Manaus (AM) (Varella, 1985).

Origem dos peixes	Igarapé do Tarumã-Açú	Estação Experimental de Piscicultura do INPA
Peixes Parasitados/Examinados	12/20	20/25
Prevalência	60%	80%
Intensidade média	16	52
Densidade relativa	9,6	41,6
Total de parasitos	191	1038

Os danos causados por *E. bryconis* às brânquias dos matrinxãs foram: infiltração de células, especialmente leucócitos; hiperplasia epitelial, proliferação de células epiteliais; metaplasia epitelial, transformação de células epiteliais em células mucosas; fusão de lamelas e destruição da capa epitelial do filamento. Estas reações ocorreram tanto na área de penetração das antenas, como à altura da boca, de onde o parasito retirava seu alimento (Figura 3) (Varella, 1985).
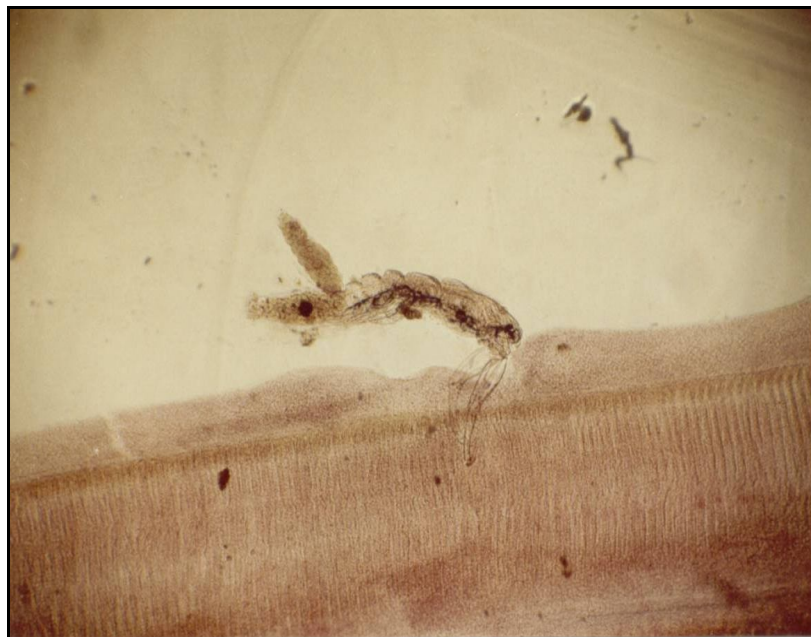
Figura 3. Filamento branquial de matrinxã *B. amazonicus*, parasitado

por uma fêmea adulta de *Ergasilus bryconis*. Varella, (1985).

O desenvolvimento do ciclo de vida de *E. bryconis* apresentou três estágios naupliares e cinco de copepodito. A partir do terceiro estágio de copepodito o dimorfismo sexual foi evidenciado. Nesse estudo, dados ecológicos relacionando peixes provenientes da natureza e de tanques de piscicultura com os copépodos parasitos encontrados, mostraram que os peixes confinados apresentaram maiores índices de parasitismo que os do ambiente natural (Varella, 1985).

Parasitos de juvenis de matrinxãs coletados na natureza e criados em canais de igarapé

No estado do Amazonas, uma forma recente de cultivo intensivo de *B. amazonicus* é a criação em canais de igarapé (Figura 4). Essa modalidade foi introduzida pelo Programa de Criação Intensiva de Matrinxãs em Canais de Igarapé (PROCIMA/INPA) em comunidades assistidas pelo programa de assentamentos do Instituto Nacional de Colonização e da Reforma Agrária (INCRA), como importante alternativa proteíca. No estado, esse tipo de criação sustentável foi implantado em dois municípios (Manaus e Presidente Figueiredo) favorecidos pela grande abundância de igarapés. Neste tipo de criatório, as paredes do igarapé são alargadas e reforçadas com telas plásticas e/ou sacos de ráfia cheios (mistura de areia com cimento) e com madeiras da própria região, o excesso de areia e matéria orgânica também são removidos do leito. O trecho do igarapé passa então a medir aproximadamente 20 m de comprimento, 4 m de largura e 75 cm de profundidade. Além disso, na parte inicial do sistema também é construído um “reservatório” com queda de água contínua para o canal de igarapé. Assim, esse sistema de criação se assemelha ao sistema de cultivo norte-americano conhecido como “raceways”.

Figura 4. Vista geral de um canal de igarapé construído na região do Rio Tarumã-Mirim, Manaus (AM) para cultivo de *B. amazonicus*.

A fauna parasitológica de 1.000 juvenis provenientes de uma criação intensiva de matrinxã, *B. amazonicus* em canal de igarapé, localizada em uma propriedade na estrada de Puraquequara, a 17 km da cidade de Manaus (AM) foi monitorada (Andrade, 2000). Os espécimes dessa criação foram capturados juvenis no lago Catalão, margem direita do Rio Negro, e no Rio Solimões, próximo à ilha da Marchantaria e mantidos na estação de piscicultura de Manaus durante seis meses. Posteriormente, foram transferidos para a criação no canal de igarapé e criados (engorda) durante cinco meses. No início do experimento mediam em média 15 cm de comprimento furcal e 110g de peso e a densidade de estocagem foi de 1,3kg/m^3 (Andrade & Malta, 2006).

Foram coletados 80 espécimes para necropsia, verificando-se que 89,0% estavam parasitados por monogenóideos; 15,0% por nematóides e 3,75% por ergasilídeos. Os monogenóideos encontrados na pele e brânquias foram: *J. amazonensis*; *T. kerri*; *T. brazilensis* e *A spiralocirrus*. *T. brazilensis* foi à espécie que apresentou a maior prevalência (81,0%), seguido pelo *A spiralocirrus* (71,0%), *J. amazonensis* (71,0%) e *T. kerri* (30,0%) (Andrade & Malta, 2006).

Os maiores índices de parasitismo de *J. amazonensis* ocorreram na estação chuvosa. Os índices parasitários dos matrinxãs criados em canal de igarapé foram baixos, indicando que os sistemas de criação com fluxos de água rápidos dificultam o ciclo de vida de alguns parasitos ao contrário do que ocorre em sistemas com baixo fluxo de água (Andrade, 2000; Andrade & Malta, 2006).

Em matrinxãs criados em condições de canal de igarapé, os parasitos monogenóideos apresentaram tendência para se fixarem em diferentes partes dos filamentos branquiais. *Anacanthorus spiralocirrus* e *T. kerri* fixaram-se na porção média dos filamentos, embora, a população de *A spiralocirrus* fosse bem maior. *Trinibaculum brazilensis* fixava-se nas regiões basais, próximas aos rastros branquiais e *J. amazonensis* ocorreu em toda a extensão dos filamentos branquiais (Tabela 5) (Andrade, 2000).

A espécie de Nematoda *S. inopinatus* ocorreu na porção anterior do intestino de *B. amazonicus* (Tabela 4), apresentando baixa ocorrência e intensidade de parasitas durante o período avaliado. Além disso, esses espécimes de *B. amazonicus* estavam infectados por *E. bryconis* (3,75%) em baixa ocorrência e intensidade (Andrade, 2000).

Tabela 5 - Locais de fixação dos parasitos de *B. amazonicus* coletados em canal de igarapé estrada de Puraquequara, a 17 km da cidade de Manaus (Andrade, 2000).

Grupos/Espécies	Local de fixação
Monogenea	
Anacanthorus spiralocirrus	Porção intermediária dos filamentos branquiais e superfície do corpo
Trinibaculum brazilensis	Porção basal dos filamentos branquiais e superfície do corpo
Tereancistrum kerri	Porção intermediária dos filamentos e superfície do corpo
Jainus amazonensis	Todo filamento branquial e pele
Nematoda	
Spirocamallanus inopinatus	Porção anterior do intestino
Copepoda	
Ergasilus bryconis	Filamentos branquiais

Parasitos de matrinxãs produzidos em piscicultura e criados em canais de igarapé

As brânquias de 150 juvenis e jovens de *B. amazonicus*, pesando de 18,0 a 38,0 g e medindo de 11,0 a 15,3 cm, criados em três canais de igarapé da região do Tarumã-Mirim (Manaus, AM) foram examinadas. Das amostras analisadas, 25,0% apresentaram parasitismo pelo protozoário *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 (18,0%) e por *Placobdella* sp. (7,0%) Blanchard 1893 (Hirudinea, Glossiphonidae). A prevalência de *I. multifiliis* (Figura 5) em três diferentes canais de igarapé foi de 22%, 18% e 14%, respectivamente (Lemos et al., 2007).
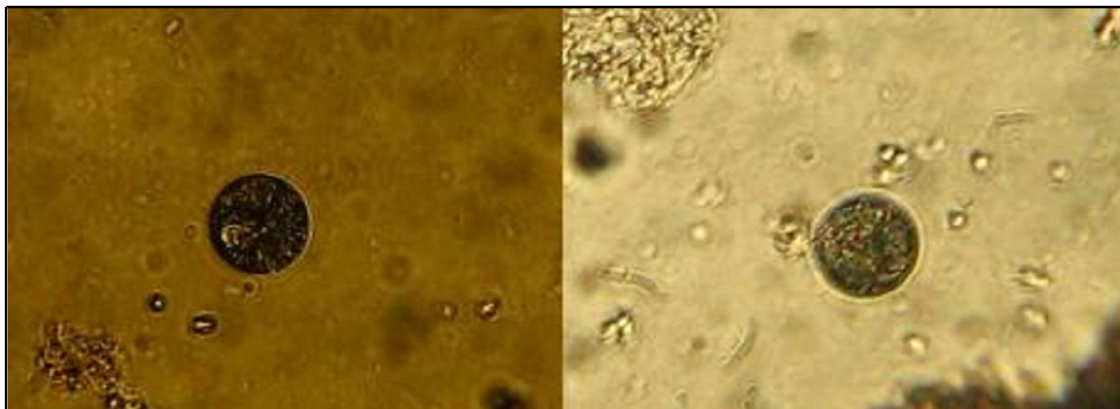
Figura 5. *Ichthyophthirius multifilis* Fouquet 1876 em brânquias de matrinxãs de canais de igarapés do Tarumã-Mirim, Manaus (AM).

Parasitos de juvenis de matrinxãs criados em tanques-rede

Em um experimento para obtenção de *B. amazonicus* de 300-400g foram necropsiados 90 peixes durante o período de criação. Do total, 6,7% estavam parasitados pelo Monogenoidea *J. amazonensis*, 3,3% por larvas plerocercóides de Cestoda, 1,7% por Copepoda *E. bryconis* e 0,8% por Acanthocephala *Echinorhynchus* sp.

Na larvicultura, os peixes estavam parasitados por larvas plerocercóides de Cestoda. Na recria, em tanques escavados, por *J. amazonensis*. Na recria em tanques-rede por *Echinorhynchus* sp. e *J. amazonensis*. Na engorda, os matrinxãs estavam parasitados por *J. amazonensis* e *E. bryconis*.

Considerações finais

Em geral, matrinxãs cultivados apresentaram os mesmos parasitos que ocorrem nessa espécie em ambiente natural. Porém, os níveis de infecções variaram entre peixes das diferentes formas de cultivo praticadas no estado do Amazonas.

Referências

ANDRADE, S. M. S. 2000. *Monitoramento da fauna parasitológica de das condições de manejo do matrinxã Brycon cephalus (Günther, 1869) em sistema de cultivo intensivo em canal de igarapé no estado do Amazonas*. 100f. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) – Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas.

ANDRADE, S. M. S.; MALTA, J. C.; FERRAZ, E. 2001. Fauna parasitológica de alevinos de matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) coletados nos Rios Negro e Solimões, na Amazônia Central. *Acta Amazonica*, 31(2): 263-273.

ANDRADE, S. M.; MALTA, J. C. O. 2006. Parasite fauna monitoring of mariachi *Brycon cephalus* (Günther, 1869) raised in a stream channel intensive husbandry system in the state of Amazonas. *Braz. J. Biol*., 66: 1123-1132.

BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ, J. M.; SHOSTAK, W. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al*. revisited. *J. Parasitol.,* 83: 575-583.

HANADA, M. P. S. 2003. *A fauna parasitária de larvas e juvenis do matrinxã, Brycon cephalus (Günther, 1869) produzidos em uma estação de piscicultura no Estado do Amazonas*. 24f. Monografia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas.

LEMOS, J. R. G.; TAVARES-DIAS, M.; SALES, R. S. A.; NOBRE FILHO, G. R.; FIM, J. D. I. 2007. Parasitos nas brânquias de *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829) cultivados em canais de Igarapé do Tarumã-Mirim, Estado do Amazonas, Brasil. *Acta Sci. biol. Sci.* 29: 217–222.

LIMA, F. C. T. 2001. *Revisão taxonômica do gênero Brycon Müller & Troschel, 1844, dos rios da América do Sul cisandina (Pisces, Ostariophysi,*

Characiformes, Characidae). 312f. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, São Paulo.

LIMA, F. C. T. 2003. Subfamily Bryconinae (Characins, Tetras). In: Reis, R.E.; Kulander, S.O.; Ferraris Jr, C.J. (Ed.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDPURCS. p. 4-181.

MALTA, J. C. O.; VARELLA, A. 1998. Maxillopoda - Copepoda - Poecilostomatoida. In: Young, P. (Ed.). *Catalogue of Crustacea of Brasil.* Rio de Janeiro: Museu Nacional. p. 241-249.

MALTA, J. C. O.; VARELLA, A. M. B. 2000. *Argulus chicomendesi* sp. n. (Crustacea: Argulidae) parasita de peixes da Amazônia brasileira. *Acta Amazonica*, 30: 481-498.

MALTA, J. C. O.; GOMES, A. L. S.; ANDRADE, S. M. S.; VARELLA, A. M. B. 2001. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956, (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) em tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) cultivados na Amazônia central. *Acta Amazonica*, 31(1): 133-143.

MALTA, J. C. O.; VARELLA, A. M. B. 2006. Os crustáceos branquiúros parasitas de peixes (Argulidae: Maxillopoda). In: FONSECA, C.R.V.; MAGALHÃES, C.; RAFAEL, J. A.; FRANKLIN, E. (Ed.). *A Fauna de Artrópodos da Reserva Florestal Adolpho Ducke. Estado Atual do Conhecimento Taxonômico e Biológico.* Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. p. (no prelo)

PIZANGO-PAIMA, E. G. 1997. *Estudo da alimentação e composição corporal do matrinxã Brycon cephalus (Günther, 1869) (Characiformes, Characidae) na Amazônia Central*. 75 f. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) – Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas.

THATCHER, V. E. 1991. Amazon fish parasites. *Amazoniana*, 11: 263-572.

THATCHER, V. E. 2006. *Amazon fish parasites*. 2ed. Sofia, Moscow: Pensoft Publishers.

TRAVASSOS, L. 1926. Trematódeos novos. *Boletim Biológico*, 1: 16-20.

VARELLA, A. M. B. 1985. *O ciclo biológico de Ergasilus bryconis, Thatcher, 1981 (Crustacea: Poecilostomoitoida, Ergasilidae) parasita das brânquias do matrinxã, Brycon erytropterum (Cope, 1872) e aspectos de sua ecologia.* 99f. Natal: Ed. Universitária UFRN.

VARELLA, A. M. B. 1994. *Gamidactylus bryconis* sp. n. (Copepoda, Poecilostomatoida, Vaigamidae) nas fossas nasais de peixes, *Brycon pellegrini* Holly, 1929 e *B. melanopterus* (Cope, 1872) da Amazônia brasileira. *Acta Amazonica*, 24: 145-152.

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 18

Manejo y estado actual del conocimiento de los parásitos de peces cultivados en Argentina

Rubén Daniel Tanzola, Liliana Semenas & Gustavo Viozzi

Resumen

La acuicultura en Argentina ha experimentado un lento pero sostenido crecimiento en las últimas décadas. Con excepción de la trucha arco iris que se exporta, el resto de los productos satisfacen la demanda del mercado interno. En la actualidad, sólo cuatro especies introducidas se cultivan con fines comerciales y/o de repoblamiento: la trucha arco iris, el amur o pez de las hierbas y dos especies de tilapia. El pacú es la única especie autóctona cultivada a escala comercial, al que le siguen el pejerrey, con fines de repoblamiento, y especies ornamentales. El objetivo del presente trabajo es brindar un panorama de las especies bajo cultivo en Argentina, el estado de situación respecto de los parásitos potencialmente riesgosos y cuál es el manejo previsto para evitar posibles epizootias. Los parásitos que se transmiten en forma directa, como protozoos, monogeneos y crustáceos, comportan un grupo de especial interés sanitario en la acuicultura tanto continental como marina. La trucha arco iris en ambientes naturales es parasitada por 22 especies de metazoos. En cultivo se han descripto infecciones por digeneos (diplostomiosis) y detectado flagelados del género Spironucleus. La presencia de larvas plerocercoides de Diphyllobothrium spp. confiere interés zoonótico al consumo de truchas insuficientemente cocidas. Sólo se conocen en Argentina hasta el presente, seis especies de helmintos intestinales parásitos del pacú, no conociéndose registros publicados de parásitos en cultivos. Tampoco se conocen registros de parásitos en tilapias cultivadas en territorio argentino. El amur presenta dos especies de helmintos en ambientes naturales, aunque no se conocen registros de parásitos en acuiculturas. El bagre sapo ha sido investigado desde el punto de vista parasitológico y en sus ambientes naturales se han identificado tres especies de protozoos y 12 de metazoos parásitos. Además, se citan

parasitosis en varias especies ornamentales en criaderos, principalmente provocadas por ciliados, monogeneos y nematodos. Se desconoce la ocurrencia de episodios de mortandad en cautiverio debida a parásitos. Se puede concluir que el conocimiento de los parásitos de peces de interés acuícola en Argentina es incipiente y deberá acompañar el crecimiento que está experimentando la actividad en todo el territorio del país.

Abstract

Aquaculture has shown a low but sustained growth in Argentina during the last decades. Except for the rainbow trout, a fish resource for export, the other fish resources from Argentina fully cover the domestic market demands. At present, only four exotic species are cultured both for commercial purposes and/or to repopulate natural environments. These are the rainbow trout, the grass carp and two species of tilapia. Pacu is the only native species which is cultured at commercial scale, followed by pejerrey and ornamental species. The purpose of this update is to provide information on the variety of species under culture in Argentina, a state-of-the-art report on potentially dangerous parasites and on management strategies to avoid possible outbreaks. Directly transmitted parasites such as protozoans, monogeneans and crustaceans, all form a group of particular sanitary interest in continental as well as marine aquaculture. Rainbow trout in natural environments is parasitized by 22 species of metazoans. Displostomiosis has been reported in rainbow trout reared in fish farms and flagellates of the genus Spironucleus have been detected in those conditions, too. The presence of plerocercoid larvae of Diphyllobothrium spp. has zoonotic interest by the consumption of trout not well cooked. Up to now, only six species of intestinal parasites were recorded in pacu and no published records of parasites in fish farms are known. Also, there are no records of parasites in cultured tilapias within the Argentine territory. Grass carp was found parasitized by two species of helminthes in natural environments although there are no records of parasites in farms to date. South American catfish has been thoroughly studied from a parasitological point of view. Three species of protozoans and 12 species of metazoans have been identified in its natural environments. On the other hand, several ornamental species, both native and exotic, reared in aquaria, have been found parasitized, particularly by ciliates, monogeneans and nematodes. Occurrence of parasite-derived mortality in captivity has not been recorded. Finally, it can be remarked that the knowledge of parasitism in cultured fish from Argentina is incipient and it should therefore accompany the growth that is evidenced by aquaculture in the whole country.

Introducción

La piscicultura en Argentina no es suficientemente reconocida y es considerada una actividad “no tradicional”. Desde 1902 hasta 1980, existió en nuestro país un período dedicado a la “acuicultura extensiva”, propiciada desde el Estado Nacional, con producción de alevinos de salmónidos (truchas y salmones) en Patagonia y con el apoyo a la difusión de las actividades relacionadas con el pejerrey y la perca, con el objeto de implantar

poblaciones en ambientes naturales, o bien, para la práctica de la pesca deportiva. La producción comercial procedente de la acuicultura, fue iniciada alrededor de la década de 1970 (Prieto & Del Valle, 1996). La década de 1990 trajo consigo un mayor crecimiento en el área de la acuicultura comercial, con el aumento de la producción de trucha arco iris que hasta entonces se cultivaba en emprendimientos privados de tipo “artesanal”. Dentro de este período, la acuicultura dejó de ser solamente el cultivo de salmónidos para aumentar en producción y luego, a fines de la década del ´90, agregar otro tipo de producciones con la consiguiente diversificación de especies. Con excepción de la trucha arco iris que se exporta, el resto de los productos acceden a mercados locales, regionales y al metropolitano (Luchini & Panné Huidobro, 2008). Así, el cultivo de peces en Argentina pasó a ser una interesante alternativa de negocio consolidándose progresivamente en el país y en los mercados, experimentado un lento pero sostenido crecimiento con una producción total de alrededor de 3.000 toneladas anuales (Wicki, 2005; Luchini & Panné Huidobro, 2008).

Luchini (2004) delimita cuatro cuencas geográficas en relación a la producción acuícola en Argentina, cada una de ellas caracterizada por rasgos ambientales, climáticos e hidrográficos, bien definidos. En tal sentido, en la cuenca templado-cálida y subtropical, que comprende las provincias del norte (Jujuy, Salta, Formosa, Chaco, Misiones, Corrientes y norte de Santa Fe) se destaca el pacú como principal producto con unas 300 toneladas anuales (Wicky, 2005). En la zona templado-fría cordillerana (provincias de Neuquén y de Río Negro, principalmente) se produce el mayor porcentaje de trucha arco-iris, habiéndose estimado en 1.640 toneladas para 2008. En tanto en la región pampásica, con clima templado continental (principalmente en las provincias de Buenos Aires, de Córdoba y de La Pampa) se produce el resto de trucha arco iris y de pejerrey para repoblamiento de sistemas lagunares (Figura 1).

La fauna de peces continentales de Argentina está conformada por 347 especies (López et al., 2003), 13 de las cuales son consideradas introducidas. En la actualidad, sólo cuatro especies introducidas se cultivan con fines comerciales y/o de repoblamiento: la trucha arco iris, el amur o pez de las hierbas y dos especies de tilapia. A estas especies se agrega el pacú como única especie autóctona cultivada a escala comercial. En menor proporción se cultivan, otra especie autóctona, el pejerrey y especies ornamentales.

Los dos elementos fundamentales que deben ser tenidos en cuenta en el cultivo de peces en ambientes naturales es que los escapes son inevitables y las invasiones son irreversibles, con lo cual el impacto de la interacción de especies asociado con la acuicultura tiene entre otros efectos la introducción de parásitos y enfermedades (Arthington y Bülhdorn, 1996). En las pisciculturas, tanto marinas como de agua dulce, se ha registrado, en general, escasa presencia de helmintos parásitos, dado que éstos tienen, en su mayoría, ciclos de vida indirectos (utilizan huéspedes intermediarios), de modo que su transmisión se produce a través de relaciones depredador-presa, habituales en las poblaciones de peces que viven en condiciones naturales. En cambio, es común en pisciculturas, la presencia de parásitos que se transmiten por ciclo directo como protozoos, monogeneos, copépodos e isópodos; y aquellos que se trasmiten por ciclos indirectos en donde no hay

participación de la relación depredador-presa como en el caso de los digeneos (Carvajal & González, 1990).

El objetivo del presente capitulo es dar a conocer un panorama de las especies bajo cultivo en la actualidad en Argentina, el estado de situación respecto de los parásitos potencialmente riesgosos y cuál es el manejo previsto para evitar posibles epizootias.
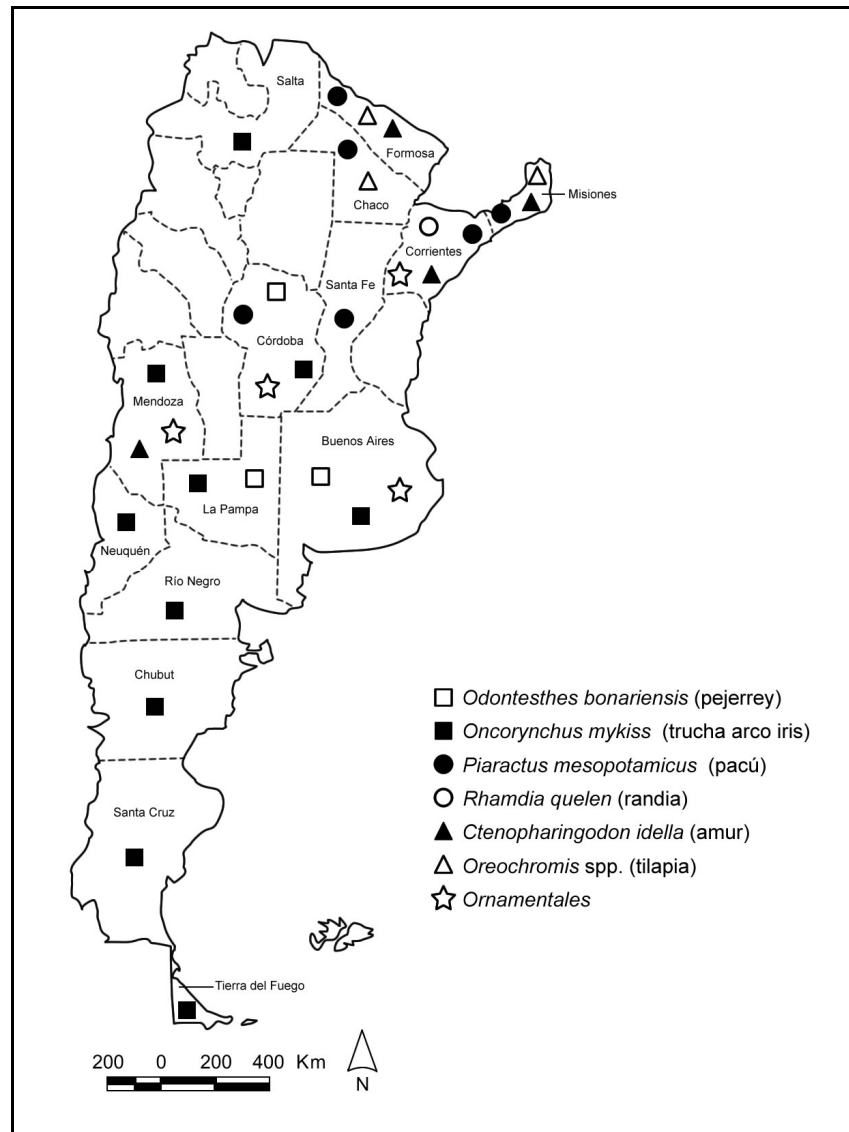
Figura 1. Distribución de los cultivos de las distintas especies en Argentina.

Principales especies cultivadas

A - La trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*

Las primeras remesas de huevos embrionados de salmónidos ingresaron a la Argentina en 1904 y estuvieron destinadas a poblamiento de ambientes naturales del Parque Nacional Nahuel Huapi en la provincia de Río Negro (Macchi, 2004). Esta introducción de salmónidos estaba incluida en un Programa diseñado por el Gobierno Nacional destinado a promover la pesca deportiva en la Patagonia (Prieto & Del Valle, 1996). La actividad salmonera empieza en 1907, cuando se realiza por primera vez el desove artificial, primero de Sudamérica, de *Salvelinus fontinalis* (trucha de arroyo) en la estación de piscicultura del Nahuel Huapi. El Centro de Salmonicultura Bariloche en la provincia de Río Negro empezó a operar en 1933 y era el principal proveedor de ovas y alevinos para ser utilizados en repoblamiento (Semenas, 1997).

De las 10 especies de salmónidos introducidas, sólo la trucha arco iris *O. mykiss*, se cultiva a escala comercial. Su cultivo experimentó un gran desarrollo a partir de la década del `70, convirtiéndose en el principal recurso acuícola, que representa actualmente el 60% de la producción ictícola total. En la actualidad, se cultiva principalmente en climas templado-fríos en las provincias de Salta, Córdoba, Buenos Aires, La Pampa, Mendoza y en todas las provincias patagónicas (Neuquén, Río Negro, Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego). Sin embargo, son las provincias de Río Negro y de Neuquén las que concentran el 90% de la producción de truchas del país.

A principios de la década del `70, dos emprendimientos ubicados en la provincia de Neuquén, Truchas de los Andes (originalmente Truchas Bariloche) y Salmonicultura Río Traful (Estancia La Primavera), ambos inexistentes actualmente, fueron los pioneros en la actividad comenzando con el cultivo intensivo de truchas para consumo humano en instalaciones ubicadas en tierra (Prieto & Del Valle, 1996).

En la década del 80, surgieron establecimientos privados de pequeñas dimensiones en las provincias de Neuquén y de Río Negro, la mayoría de los cuales dejaron de funcionar por problemas de distinta índole. También, en esta década se realizaron los primeros ensayos de cultivos en balsas jaula en el lago Lolog en 1983 (Neuquén) y en el Embalse Ramos Mejía (Río Limay) en 1984 (Prieto & Del Valle, 1996).

En la década del `90, la apertura del Embalse Alicurá como lugar de cría a través de concesiones licitadas por las provincias de Río Negro (ley provincial de Acuicultura Nº 2829/94) y de Neuquén (ley provincial de Acuicultura Nº 1996/93) permitió el desarrollo de los primeros cultivos de trucha arco-iris en jaulas suspendidas en el río Limay, con producciones de mayor volumen, que iniciaron el abastecimiento del mercado regional y nacional con continuidad e inclusive se realizaron esporádicamente algunas exportaciones (Luchini & Panné Huidobro, 2008).

En la Exposición Industrial de la Pesca y Acuicultura realizada en Mar del Plata en 2008, se reportaron 1.852 toneladas para 2007 y se estimaron unas 1640 toneladas para el 2008, producción que se destina tanto al mercado nacional como internacional.

Los cultivos se realizan en piletas, en instalaciones en tierra y en balsas jaula en lagos (Figura 2) y en embalses (Figura 3). La mayor parte de la producción proviene de 8 establecimientos con balsas jaula ubicados en el Río Limay. Otra parte de la producción de menor tonelaje, proviene de 8 establecimientos ubicados en distintas localidades en las provincias de Neuquén y de Río Negro, que utilizan mayoritariamente raceways y tanques circulares, generalmente con abastecimiento de agua gravitatorio o en algunos casos, con bombeo desde napas profundas. No existe control y tratamiento de efluentes líquidos y sólidos. El nivel de explotación es intensivo con altas densidades de cultivo, clasificaciones por talla y alimentación mediante alimento seco balanceado. Se produce básicamente trucha tamaño plato (250 gr) para consumo fresco y ejemplares hasta 2,6 kg para ahumado.

Durante 2007 y 2008, la Dirección de Acuicultura dependiente de la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura ha desarrollado el Plan Sanitario en Salmónidos relevándose todos los establecimientos ubicados en el Embalse Alicurá, no habiéndose detectado ninguna de las enfermedades que la Organización Internacional de las Epizootias (OIE) establece como de Declaración Obligatoria.

Figura 2. Piscicultura en balsas jaula en el Lago Moreno (pcia. de Río Negro).

Figura 3. Piscicultura en balsas jaula en el Embalse Alicurá (río Limay).

a) Especies parásitas registradas en la naturaleza:

En la Argentina, los registros parasitológicos de *O. mykiss* corresponden a distintos ambientes lóticos y lénticos de la Patagonia.

Digenea

- *Acanthostomoides apophalliformis* (Ortubay et al., 1994; Ostrowski de Núñez et al., 1999; Rauque et al., 2003).
- *Austrodiplostomum mordax* (Semenas et al., 1989; Ortubay et al., 1994).
- *Deropegus patagonicus* (Shimazu et al., 2000).
- *Diplostomum* sp. (Ortubay et al., 1994; Semenas, 1998).
- *Steganoderma szidati* (Rauque et al., 2003).
- *Tylodelphys destructor* (Ortubay et al., 1994).
- *Tylodelphys* spp. (Ortubay et al., 1994).

Monogenea

- Ancyrocephalinae (Semenas et al., 1989).

Cestoda

- *Ailinella mirabilis* (Rauque et al., 2003).
- *Diphyllobotrhium dendriticum* (Revenga & Semenas, 1991; Revenga, 1993; Ortubay et al., 1994).
- *Diphyllobothrium latum* (Bacigalupo & D'Alessandro Bacigalupo, 1952; Szidat & Soria, 1952; 1957; Szidat, 1964; Revenga & Semenas, 1991; Revenga, 1993).

Nematoda

- *Camallanus corderoi* (Ortubay et al., 1994; Rauque et al., 2003).
- *Contracaecum* sp. (Ortubay et al., 1994).
- *Goezia* sp. (Ortubay et al., 1994).
- *Hedruris* sp. (Ortubay et al., 1994).
- *Hysterothylacium patagonense* (Moravec et al., 1997; Rauque et al., 2003).
- *Rhabdochona* sp. (Ortubay et al., 1994).

Acanthocephala

- *Acanthocephalus tumescens* (Ortubay et al., 1994; Rauque et al., 2003).
- *Pomphorhynchus patagonicus* (Trejo, 1992, 1994; Ortubay et al., 1994).

Bivalvia

- *Diplodon chilensis* (Semenas et al., 1994; Viozzi & Brugni, 2001).

Copepoda

- *Ergasilus* sp. (Scheinert, 1998).
- *Lernaea* sp. (Gilbert et al., 1993).

b) Especies registradas en cultivo

Los registros de parásitos en truchas arco iris *O. mykiss* cultivadas en la Argentina corresponden a una espironucleosis (Noguera, com. pers.) y una diplostomiosis ocular (Semenas, 1998).

La diplostomiosis afecta tanto a peces silvestres como a cultivados en distintas regiones del mundo, provocando mortalidades masivas en sistemas de cría, especialmente bajo condiciones intensivas, pero no en ambientes naturales. El establecimiento afectado está ubicado en la localidad de Río Senguer (provincia del Chubut) y se caracteriza por ser una piscicultura con estanques en tierra, ubicados en rosario y alimentados por agua que ingresa desde una derivación del Río Senguer. Debido a la presencia en proporciones epidémicas de juveniles de trucha arco iris con ojos blanquecinos y sin mortalidad, se analizaron muestras de peces y caracoles del lugar, registrándose metacercarias de *Diplostomum* sp. en los cristalinos de las truchas (Figura 4) y cercarias que emergían de los caracoles. Para el control de esta enfermedad se utilizan fundamentalmente métodos ecológicos basados en un adecuado conocimiento de la biología de los parásitos y de su relación con los hospedadores. La interrupción del ciclo a través de la eliminación de los caracoles, la disminución de las cercarias y el alejamiento

de las aves ictiófagas se consideran fundamentales para la prevención y el control de la enfermedad (Semenas, 1998).

Figura 4. Diplostomiosis ocular en trucha arco iris *O. mykiss* de cultivo (pcia. de Chubut).

La espironucleosis provocada por *Spironucleus* sp.(Diplomonadida: Hexamitidae) correspondió a truchas cultivadas en balsas jaula. La patogenicidad de esta enfermedad es poco conocida y puede provocar mortalidad en caso de infecciones masivas. Su presencia es frecuente en aguas frías y templadas afectando a distintas especies de diferentes familias de peces. Su localización es el tubo digestivo donde las infecciones pueden alcanzar altas intensidades. Buenas prácticas y alimentos de buena calidad ayudan a disminuir el número y la severidad de los brotes de la enfermedad, utilizándose distintos tratamientos antibacterianos que se agregan a la comida (Woo & Poynton, 1995).

No obstante que existe un registro de alteraciones morfológicas asimilables a la enfermedad del torneo en trucha arco iris en un establecimiento de cultivo de la provincia de San Luis (Romano & Schuldt, 1984), el diagnóstico se realizó utilizando solamente signos clínicos sin el hallazgo del agente causal. La confirmación diagnóstica en laboratorio para demostrar la presencia del agente etiológico es esencial para asegurar la presencia de esta enfermedad (Margolis et al., 1996).

c) Especies registradas en truchas arco iris en la naturaleza potencialmente peligrosas para los peces de cultivo o por razones zoonóticas

Dado que la mayor producción se realiza en balsas jaula, adquieren especial relevancia algunas especies parásitas presentes en ambientes naturales que afectan no solamente a los salmónidos sino además a especies de peces autóctonas que se convierten en reservorios de ellos. Todo esto sugiere que están dadas las condiciones en los ambientes naturales para que estos ciclos se cumplan y por ende, para que los mismos puedan desarrollarse cuando se realizan cultivos de peces en jaulas.

En este sentido son importantes las formas larvales de los diplostómidos que afectan el cerebro como *Austrodiplostomum mordax* y *Tylodelphys destructor* y las que afectan los ojos como *Diplostomum* sp, dado que pueden modificar el comportamiento de los peces con efectos sobre la movilidad y la capacidad de capturar alimento. Los registros en Argentina indican que las diplostomiosis se distribuyen en ambientes naturales desde los 39° hasta los 54°S., correspondiendo los registros más frecuentes a trucha arco iris entre las especies introducidas, y a los galáxidos entre las autóctonas (Ortubay et al., 1994; Semenas, 1998; Viozzi et al., 2009).

Los estadios larvales de cestodes como *Diphyllobotrhium dendriticum* y *D. latum*, y del nematodo *Contracaecum* sp., con posible localización en la musculatura, revisten importancia zoonótica dado que el consumo de la carne de pescado es la vía de ingreso a hospedadores como el hombre. En el caso particular de la difilobotriosis, el hombre se infesta accidentalmente con larvas plerocercoides al consumir carne de pescado cruda, insuficientemente cocida y a veces ahumada (Von Bonsdorff, 1977). El cambio de gustos gastronómicos y el consumo creciente de comidas orientales a base de pescado crudo (sushi, sashimi), ha provocado la reemergencia de esta enfermedad en distintos lugares del mundo (Peduzzi, 1992; Ando et al., 2001; Terramocci et al., 2001; Stadlbauer et al., 2005; Wicht et al., 2008) y su aparición en otros (Erichsen-Emmel et al., 2005; Tavares et al., 2005; Alkhalife et al., 2006; Chou et al., 2006; Devi et al., 2007). Hasta la fecha se han registrado más de 30 casos humanos autóctonos, en pacientes que residen principalmente en Bariloche y en San Martín de los Andes en la región andino - patagónica de Argentina (Semenas & Úbeda, 1997; Semenas et al., 1997). La presencia de larvas plerocercoides de *D. latum* y de *D. dendriticum* se cita por primera vez para la Argentina en 1950 en los salmónidos introducidos *O. mykiss, S. fontinalis* y *Salmo salar sebago* en lagos del Parque Nacional Nahuel Huapi (Szidat & Soria, 1952; 1957). El registro actual incluye su presencia en la mayoría de los cuerpos de agua de las provincias de Neuquén, Río Negro y Chubut y además en percíctidos y galáxidos autóctonos (Ortubay et al., 1994; Semenas & Kreiter, 1995). La detección de los plerocercoides se hace dificultosa cuando se alojan en el interior de la musculatura, cuya ingestión se convierte en la principal fuente de infestación (Semenas & Kreiter, 1995; Semenas, 2006). Infestaciones masivas en truchas de mayor tamaño pueden provocar adherencias peritoneales (Figura 5) que disminuyen el valor del producto. En Chile se registró la presencia de plerocercoides en truchas cultivadas en jaulas (Torres et al., 2002). Aunque en Argentina no se han registrado casos, la práctica del cultivo de truchas en

balsas jaula permitiría que los peces accedan a los copépodos que actúan como hospedadores intermediarios del ciclo.
Otros parásitos como el gloquidio del bivalvo *Diplodon chilensis* o los adultos de los copépodos *Ergasilus* sp. y *Lernaea* sp. que se ubican en branquias o en tegumento provocan escoriaciones de distinta naturaleza que servirían como vía de entrada a infecciones secundarias por bacterias.

Figura 5. Adherencia peritoneal provocada por plerocercoides de *Diphyllobothrium* spp., en trucha arco iris pescada en el Lago Nahuel Huapi (pcia. de Río Negro).

A- EL pacú *Piaractus mesopotamicus*

El pacú *Piaractus mesopotamicus* es la única especie autóctona cultivada a escala comercial. Su elevada rusticidad, su alimentación omnívora y la excelente calidad de su carne la convirtieron en una especie de elección para su utilización en piscicultura (Wicki et al., 1998). Se la comenzó a cultivar en la región cálida subtropical en forma semintensiva y extensiva en policultivos con camarones desde 1990 (Wicki et al., 1998). Además, en algunos casos, en los estanques de cultivo se utiliza la carpa herbívora

(*Ctenopharyngodon idella*) para controlar el crecimiento de algas filamentosas y macrófitas (Wicki et al., 1998).

Actualmente se lo cultiva en las provincias de Formosa, Misiones, Corrientes y Chaco. El 80% de la producción total se realiza en 2 establecimientos ubicados en Formosa y Misiones, respectivamente. El resto corresponde a 9 establecimientos ubicados en las otras 2 provincias. En la Exposición Industrial de la Pesca y Acuicultura (2008) se reportaron 980 toneladas de producción a mediados de ese año, que se comercializa en el mercado interno y regional. En las provincias de Córdoba y Santa Fe, con climas templados, hay producción bajo invernadero para comercialización local.

La mayoría de los cultivos se realizan en estanques excavados en terreno natural con abastecimiento de agua y drenaje gravitatorio. Recientemente se han comenzado a emplear balsas-jaulas de material rígido (acero) ubicadas en ríos y represas arroceras. El nivel de explotación es intensivo, con vaciado de estanques para clasificación y cosecha y con alimentación seca balanceada.

a) Especies parásitas registradas en la naturaleza

En Argentina, sólo se estudiaron los parásitos intestinales (Hamann, 1982):

Digenea

- *Dadaytrema oxycephala*
- *Travassosinia dilatata*
- *Curumai curumai*

Nematoda

- *Rondonia rondoni*
- *Spectatus spectatus*

Acanthocephala

- *Echinorhynchus jucundus*

Estudios de pacúes capturados en la naturaleza en la zona del Pantanal en Brasil (Campos et al., 2009) revelan una fauna parasitaria similar a la registrada en la Argentina en el río Paraná a la altura de Corrientes. No se registraron únicamente *Travassosinia dilatata* y *Curumai curumai*

b) Especies registradas en cultivo

En Argentina, no hay registros publicados de especies parásitas.

c) Especies registradas en pacúes *en la naturaleza potencialmente peligrosas para los peces de cultivo o por razones zoonóticas*

El acantocéfalo *Echinorhynchus jucundus* y el nematode *Rondonia rondoni* encontrados en la naturaleza, tanto en ambientes dulceacuícolas de Brasil (Campos et al., 2009) como de Argentina (Hamann, 1982), parasitan pacúes bajo cultivo en Brasil (Ferraz de Lima et al., 1989; Kubitza, 2004). Las prevalencias en cultivo fueron mucho mayores (100%) que las registradas en el ambiente natural, tanto en Brasil (10%) como en Argentina (3,3%) para el caso del acantocéfalo pero similares para el nematode (alrededor del 80%). Los efectos patogénicos directos que produce *E. jucundus* (obstrucción intestinal, ulceraciones, necrosis y mala absorción de nutrientes) generan impacto sobre el crecimiento influyendo en la productividad de las pisciculturas (Ferraz de Lima et al., 1990).

En relación a los myxosporídeos, se han registrado distintas especies de *Henneguya* en gymnotidos y serrasálmidos que habitan los mismos ambientes naturales que el pacú (Domitrovic et al., 1991; Flores Quintana et al., 1992). En la naturaleza en la zona del Pantanal en Brasil, se encontraron 4 especies de myxosporídeos: *Henneguya piaractus* en laminillas branquiales, *Myxobolus colossomatis* en vesícula biliar, vejiga urinaria, aletas y tegumento, *Henneguya* sp. en hígado y *Myxobolus* sp. en vesicula biliar, vejiga urinaria, serosa de bazo y aletas (Adriano et al., 2002). Evaluaciones de susceptibilidad realizadas con *H. piaractus* y *M. colossomatis* en varias especies de peces indican que el pacú es el más susceptible mostrando lesiones branquiales con hiperplasia celular y secreción abundante de mucus acompañados de infiltrados inflamatorios severos (Martins et al., 1999). El hallazgo de myxosporídeos en branquias de pacúes cultivados (Ferraz de Lima et al., 1995) y el registro de mortalidades causadas por *H. piaractus* (Martins et al., 2000) indican la importancia del registro de estos parásitos en la naturaleza.

Otras especies con distinto grado de desarrollo acuícola

A - El Pejerrey *Odonthestes bonariensis*)

El pejerrey bonaerense fue la primera especie autóctona que despertó el interés para su cultivo, según las experiencias pioneras de Tulian (1908) y más tarde de Ringuelet (1943). La palatabilidad y el valor nutricional de su carne, así como lo atractivo de su captura, han convertido a esta especie en una presa altamente codiciada por pescadores deportivos y comerciales en la mayoría de las lagunas de la zona templada de Argentina. Aunque su hábitat natural son los cuerpos de agua someros de la región pampeana, ha demostrado ser altamente adaptable a otras zonas geográficas (López & García, 2001). Incluso es notable el desarrollo alcanzado por la aterinicultura en Japón, país donde fue introducido en 1968, y actualmente se lo considera una de las especies más importantes en la acuicultura y de mayor consumo del pueblo japonés. El cultivo de pejerrey se inició hacia 1904 en la cuenca templada continental, especialmente en la provincia de Buenos Aires y actualmente se lo cultiva con fines de repoblamiento de lagunas en la pampa húmeda. En Córdoba hay un criadero de pejerrey, integrado con casi 9.000

has de laguna donde se hace el mismo sistema de siembra, engorde y cosecha (pesca). Si bien la región pampeana posee un clima y una amplia extensión territorial adecuados para el desarrollo de la piscicultura del pejerrey, no se cuenta con programas oficiales ni privados tendientes a fomentarla. A pesar de su potencial aptitud para el cultivo, no se han obtenido aún resultados que justifiquen inversiones económicas en dicha actividad, como tampoco tasas de rendimiento y supervivencia adecuadas para el cultivo intensivo (Luchini et al., 1984; Strüssmann, 1989). Por esa razón es que los principales conocimientos de su comportamiento en cautiverio provienen en su mayoría de estudios experimentales, principalmente de la Estación Hidrobiológica de Chascomús, en la provincia de Buenos Aires. Ésta fue fundada en 1941 y uno de sus objetivos principales era proporcionar alevinos y juveniles de pejerrey para repoblar los cuerpos de agua pampeanos, así como mejorar el crecimiento, la productividad y la supervivencia en cautiverio, con miras a desarrollar su potencial acuícola a niveles regional y nacional (Berasain et al., 2001). Actualmente ofrece ovas y alevinos a clubes de pesca y municipios de la provincia de Buenos Aires para repoblamiento de sus lagunas y cuerpos de agua. Un equipo de la Universidad Nacional de La Pampa y de la Estación Experimental Anguil del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en La Pampa se encuentra desarrollando, en fase experimental, la cría de pejerrey en condiciones semicontroladas, en una zona semiárida del centro-oeste de esta provincia.

a) Especies parásitas registradas en la naturaleza:

Protozoa Ciliophora

- *Trichodina sp.* (García Romero, 2001).
- *Chilodonella sp.* (García Romero, 2001).

Coccidia

- *Eimeria sp*. (García Romero, 2001).

Digenea

- *Tylodelphys destructor* (Fuster de Plaza & Boschi, 1957).
- *Diplostomum mordax* (Fuster de Plaza & Boschi, 1957).
- *Diplostomulum mordax (sic*) (Szidat & Nani, 1951).
- *Diplostomum (Austrodiplostomum) compactum* (Ostrowski de Núñez, 1977).
- *Diplostomum sp.* (García Romero, 2001).

Cestoda

- *Cangatiella macdonaghi* (Fuster de Plaza & Boschi, 1957; García Romero, 2001; Mancini et al., 2008; Tanzola et al., 2009).
- *Cestodes sin determinar (probablemente C. macdonaghi)* (Mac Donagh, 1928).

Nematoda

- *Contracaecum sp*. (Fuster de Plaza & Boschi, 1957; García Romero, 2001; Mancini et al., 2008; Tanzola et al., 2009).
- *Nematodes sin determinar* (Mac Donagh, 1928).

Crustacea

- *Lernaea cyprinacea* (Mancini et al., 2008; Tanzola et al., 2009).
- *Argulus sp.* (García Romero, 2001).

b) Especies parásitas registradas en cultivo

En cultivos experimentales se registra la presencia de un monogeneo gyrodactylido en branquias (Semenas, com. pers.).

c) Especies registradas en el pejerrey bonaerense en la naturaleza potencialmente peligrosas para los peces de cultivo o por razones zoonóticas

La riqueza de especies parásitas presentes en el pejerrey es relativamente baja en los ecosistemas estudiados hasta hoy. La presencia de argúlidos en ambientes naturales y la factibilidad de ingreso a sistemas de jaulas flotantes, representa un riesgo potencial para los pejerreyes, en virtud de haberse demostrado un rol activo de estos crustáceos en la transmisión de virus, bacterias y hongos (Ahne, 1985; Cusack & Cone, 1986; Auró de Ocampo, 1996). La presencia de larvas de anisákidos del género *Contracaecum* ha despertado cierta preocupación por su posible transmisión al hombre. Sin embargo es altamente probable que se trate de estadíos larvales que alcanzan su madurez reproductiva en aves piscívoras (garzas, bigüás, gaviotas, etc.). No se ha demostrado hasta el presente la capacidad migratoria al músculo del pez de dichos anisákidos ni la capacidad de invasión intestinal en mamíferos. Ambos temas han comenzado a investigarse en uno de nuestros laboratorios (POA) con resultados aún preliminares. La infestación por adultos de *C. macdonaghi* no reviste importancia sanitaria dado el escaso daño exfoliativo que produce en la mucosa intestinal del pez (García Romero, 2001).

B - Las tilapias *Oreochromis niloticus* e *O. mossambica*

Las especies de cíclidos del género *Oreochromis* son originarias de África tropical. Vulgarmente se las conoce con el nombre de “tilapias” (en lengua *swahili* significa “*pez*”). A nivel mundial ocupan el segundo lugar en producción acuícola continental luego de la carpa común (*Cyprinus carpio*), especie junto a la cual comúnmente se la cría en policultivos en estanques excavados en tierra. En Argentina es un recurso acuático con poca divulgación en los mercados. Se la cultiva en áreas subtropicales (provincias de Chaco, Formosa y Misiones) desde 1996 con valores de producción que han crecido desde 5 toneladas en el 2003 (Wicki, 2005) a cifras estimadas en 50 toneladas para el 2008 (Luchini y Panné Huidobro, 2008). Sin embargo,

en Argentina aún se considera una producción acuícola de muy baja escala. En países en desarrollo representa un importante recurso de exportación, siendo Estados Unidos el principal país demandante. Por la calidad de su carne blanca, su alto contenido proteico y su delicado sabor se ha constituido en un sustituto óptimo de las especies marinas, cada vez más costosas y escasas.

Son peces sensibles a las temperaturas extremas, con un óptimo de aguas francamente cálidas, entre 28 y 30°C. En aguas frías, por debajo de los 10°C sufren de diversas infecciones y enfermedades y por debajo de los 20°C no se reproducen. Mediante manejo hormonal es posible lograr la conversión sexual a machos, que crecen más rápido y son de mayor talla que las hembras. En su rango de temperaturas óptimas presentan crecimiento rápido, tolerancia a altas densidades y a amplias variaciones de salinidad y concentraciones de oxígeno disuelto, resistencia a enfermedades, alta capacidad de hibridación y aceptación de una amplia gama de alimentos. Cabe destacar que la plasticidad fenotípica, la adaptabilidad ecológica y el cuidado parental de huevos y alevinos, le confieren un elevado rendimiento reproductivo convirtiéndose en potenciales competidores para las especies nativas, a riesgo incluso de extinguirlas. Por ello, la posibilidad de manejar en cautiverio la proporción sexual, desarrollando sólo machos a demanda, disminuye los riesgos de expansión, por escapes accidentales de pisciculturas, hacia los ambientes naturales circundantes (Pérez et al., 2004).

a) Especies parásitas registradas en la naturaleza

López et al. (2003) hacen referencia de la presencia de *Tilapia* cfr. *rendalii*, especie introducida, en tributarios del Río Paraná, en la provincia de Misiones. Sin embargo, en Argentina no se han hallado parásitos en ambientes naturales. En México, África y Medio Oriente, se han reportado diversos parásitos en *Oreochromis* spp. en la naturaleza (García et al., 1993; Paperna, 1996; Salgado-Maldonado et al., 2005). Entre los principales grupos parásitos registrados se cuentan metacercarias de digeneos diplostómidos enquistadas en tegumento, ojos y telencéfalo; microsporidios enquistados en parénquima renal y varias especies de monogeneos en branquias.

b) Especies parásitas registradas en cultivo

En Argentina, no hay registros de especies parásitas de tilapias en cultivo.

c) Especies registradas en tilapias en la naturaleza potencialmente peligrosas para los peces de cultivo o por razones zoonóticas

Los juveniles de *O. mossambica* sufren severos daños por metacercarias de *Euclinostomum heterostomum* enquistadas en las vísceras (Paperna, 1996). Las tilapias son suceptibles a la infección por *Lernaea* spp.

C - Carpa herbívora, sogyo o amur blanco *Ctenopharyngodon idella*

Este ciprínido fue introducido en 1970 desde Japón con fines de aprovechar su peculiar comportamiento herbívoro, para utilizarlo en el control de malezas acuáticas. Primeramente se lo sembró en la laguna El Burro, en la provincia de Buenos Aires y luego se lo introdujo en las provincias de Mendoza, Corrientes, Formosa y Misiones, donde se lo cultiva para consumo humano. Es un pez que se ha aclimatado satisfactoriamente a los ambientes de agua dulce de Argentina, alcanzando tallas y pesos que superan los 50 cm y los 4 kg, respectivamente. En su ambiente natural consume con avidez macrófitas y macroalgas acuáticas como camalotes (*Eichornia* spp.), helechitos de agua (*Pistia* spp.), lemnáceas (*Lemna* spp.) y algas filamentosas (*Cladophora* sp., *Chara* sp., *Nitella* sp.). Su carne es sabrosa y de elevado contenido nutricional. Estadísticas oficiales reportan una producción de 20 toneladas para el año 2003, la mayor parte de la cual procede de cultivos de baja escala en la provincia de Misiones (Wicki, 2005).

a) Especies parásitas registradas en la naturaleza:

Monogenea

- Dactylogyridae (probablemente *Dactylogirus ctenopharingodonis*) (Tanzola com.pers.)

Nematoda

- *Pseudocapillaria tomentosa* (Tanzola, com.pers.).

b) Especies parásitas registradas en cultivo

En Argentina, no hay registros de especies parásitas en cultivo para *C. idella*.

c) Especies registradas en C. idella en la naturaleza potencialmente peligrosas para los peces de cultivo o por razones zoonóticas

Se han encontrado infecciones por monogeneos dactylogiridos con prevalencias del 100% en carpas juveniles, introducidas en los canales de riego del valle inferior del Río Colorado, con intensidades importantes que pueden disminuir la condición de los peces. Los nematodes capiláridos infectan el intestino y provocan cuadros de emaciación y destrucción de la mucosa. Se han descripto mortandades por estos nematodes en cíclidos y silúridos neotropicales mantenidos en acuarios (Paperna, 1996).

D - El bagre sapo, negro o lagunero *Rhamdia quelen*

De la abundante diversidad de siluriformes neotropicales, el bagre sapo, negro o lagunero, es quien hasta el presente ha demostrado las mejores aptitudes para el cultivo. Desde las dos últimas décadas, se realizan investigaciones con el objeto de desarrollar tecnologías de cultivo y lograr su introducción en el mercado regional, nacional y de exportación (Luchini & Avendaño, 1983; 1985; Luchini, 2004; Sánchez et al., 2008). Su excelente carne, rendimiento y valor nutricional, su adaptabilidad a climas subtropical y templado así como su amplia distribución geográfica, han convertido a este pimelódido en un recurso promisorio para la piscicultura continental de Argentina. En el Centro Nacional de Desarrollo Acuícola (CENADAC) en Corrientes dependiente de la Dirección de Acuicultura de la Nación, se ha desarrollado la técnica de fertilización inducida, alevinaje, pre-engorde y engorde hasta su presentación en formato comercial (Rossi & Luchini, 2007; Wicki et al., 2007). Actualmente se lo cultiva en la región mesopotámica y se lo comercializa en el mercado local y regional.

a) Especies parásitas registradas en la naturaleza:

Protozoa

- *Spironucleus sp* (Vanotti & Tanzola, 2005) (Figura 6)
- *Trichodina sp.* (Vanotti & Tanzola, 2005).
- *Ichthyophthirius multifiliis* (Vanotti & Tanzola, 2005).
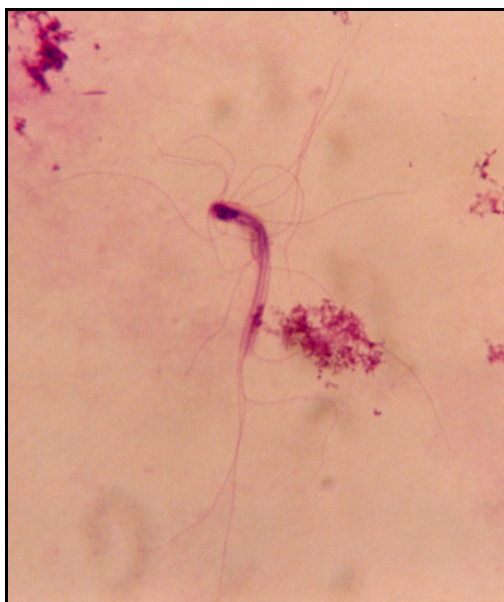
Figura 6. *Spironucleus* sp. (trofozoíto) de la vesícula biliar de *R. quelen* (coloración de Giemsa, X1000).

Monogenea

- *Urocleidoides mastigatus* (Suriano, 1986; Vanotti & Tanzola, 2005).

Digenea

- *Acanthostomum gnerii* (Ostrowski de Núñez & Gil de Pertierra, 1991; Gil de Pertierra & Ostrowski de Núñez, 1995; Vanotti & Tanzola, 2005) (Figura 7)
- *Thometrema overstreeti* (Gil de Pertierra & Ostrowski de Núñez, 1995).
- *Thometrema sp.* (Vanotti & Tanzola, 2005).
- *Genarchella parva* (Gil de Pertierra & Ostrowski de Núñez, 1995).

Figura 7. *Acanthostomum gnerii* del intestino de *R. quelen* (coloración carmín clorhídrico, x 100).

Cestoda

- *Proteocephalus jandia* (Gil de Pertierra & Ostrowski de Núñez, 1990; Vanotti & Tanzola, 2005).
- *Proteocephalus bagri* (Gil de Pertierra, 2002).
- *Proteocephalus rhamdiae* (Gil de Pertierra, 2002).

Nematoda

- *Hysterothylacium rhamdiae* (Brizzola & Tanzola, 1995; Vanotti & Tanzola, 2005).
- *Cucullanus pinnai* (Vanotti & Tanzola, 2005).

Crustacea

- *Argulus violaceus* (Vanotti & Tanzola, 2005).
- *Lernaea cyprinacea* (Vanotti & Tanzola, 2005) (Figura 8).

Figura 8. *Lernaea cyprinacea* en tegumento de *R. quelen*.

b) Especies registradas en cultivo

En Argentina, no hay registros documentados de especies parásitas de *R. quelen*.

c) Especies registradas en R. quelen en la naturaleza potencialmente peligrosas para los peces de cultivo o por razones zoonóticas

Se destacan entre las especies potencialmente peligrosas los protozoos *Ichthyophthirius multifiliis* y *Spironucleus* sp. La primera de ellas produce debilitamiento y estrés que pueden llevar a la muerte a juveniles y adultos cuando están intensamente infectados en cautiverio. Al respecto Keim (1982) destaca la pérdida masiva de ejemplares de cultivo en el laboratorio del Instituto Nacional de Pesca (INAPE) y la Estación de Salto, ambos en Uruguay. Las especies de flagelados del género *Spironucleus* han sido involucradas con severas lesiones sistémicas semejantes a la llamada "hole-in-the head" de los cíclidos (Tanzola & Vanotti, 2008). Las infestaciones masivas de monogeneos pueden comprometer la supervivencia de las larvas. En lagunas del sudoeste bonaerense se han registrado ejemplares adultos con altas cargas de argúlidos (>200 individuos) lo que significa no sólo el daño irritativo de las secreciones tóxicas inyectadas, sino la potencial vehiculización de agentes microbianos.

E - Peces ornamentales

A nivel internacional el comercio de peces ornamentales mueve un importante mercado con casi 4.000 millones de dólares entre importaciones y exportaciones (Panné Huidobro & Luchini, 2008). La mayor parte de las especies comercializadas son peces de agua dulce. Los principales países productores se ubican en áreas tropicales tales como Venezuela, Brasil, Tailandia e Indonesia. En Sudamérica se extraen anualmente más de 100 millones de ejemplares de unas 400 especies, principalmente cíclidos y siluriformes. La principal actividad es la captura en ambientes naturales. Dado que un importante número de especies se encuentran categorizadas como vulnerables o en riesgo de extinción se insiste y alienta desde organismos públicos, a que las empresas dedicadas al comercio, desarrollen el cultivo de especies autóctonas, como una manera de reducir el impacto de la sobre-explotación (Panné Huidobro & Luchini, 2008). Los principales países que tradicionalmente se han especializado en reproducción y propagación de peces ornamentales de agua dulce son Tailandia, Indonesia, Singapur, China, Malasia y Japón. En tanto en Sudamérica, Venezuela cuenta con numerosos establecimientos dedicados a la cría. En Argentina, la mayor parte de las especies ornamentales autóctonas exportadas proviene del NE y los principales países compradores son USA, Chile, Singapur, Alemania, Canadá y Brasil. Algunas especies de cyprínidos y cyprinodontiformes exóticos producidas en criaderos de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Mendoza y Corrientes, también son exportadas. Durante 2007, Argentina exportó alrededor de 800.000 especímenes pertenecientes a 12 órdenes de peces, entre los que se destacan los characiformes (mojarras) y siluriformes (viejas del agua y limpiafondos), por su variedad de formas y colores que despiertan la atracción de acuaristas de todo el mundo.

a) Especies parásitas registradas en la naturaleza:

1) *Astyanax* spp. (piky):

Digenea

- *Thometrema rioplatense* (Lunaschi, 1988).

2) *Corydoras paleatus* (limpiafondo):

Monogenea

- *Philocorydoras platensis* (Suriano, 1989).

Cestoda

- *Proteocephalus* (Miranda, 2002).
- *Dilepididae* (Miranda, 2002).

Nematoda

- *Contracaecum* sp. (Miranda, 2002).
- *Procamallanus* sp. (Miranda, 2002).

3) *Gymnogeophagus australis* (chanchita):

Digenea

- *Homalometron pseudopallidum* (Martorelli, 1986).

- *Loricaria anus* (vieja del agua)

Monogenea

- *Demidospermus anus* (Suriano, 1983).

b) Especies registradas en acuarios ornamentales y criaderos:

1) *Astyanax* spp. (piky):

Protozoa

- *Trichodina* spp. (Miranda, 2002).

2) *Corydoras paleatus* (limpiafondo):

Protozoa

- *Ichthyophthirius multifiliis* (Miranda, 2002; Tanzola, com.pers.).

3) *Discus* sp. (pez disco):

Nematoda

- *Procamallanus* sp. (Tanzola, com.pers.)

4) *Paracheirodon* sp. (tetra neón):

Protozoa

- *Ichthyophthirius multifiliis* (Tanzola, com.pers.).

5) *Paracheirodon axelrodi* (tetra cardenal):

Nematoda

- *Procamallanus* sp. (Tanzola, com.pers.).

6) *Pterophyllum scallare* (escalar):

Protozoa
- *Amyloodinium* sp. (Tanzola, com.pers.)
- *Ichthyophthirius multifiliis* (Tanzola, com.pers.)

7) *Xiphophorus helleri* (espada rojo):

Protozoa
- *Ichthyophthirius multifiliis* (Tanzola, com.pers.).

8) *Xiphophorus maculatus* (platys):

Protozoa
- *Ichthyophthirius multifiliis* (Tanzola, com.pers.).

c) Especies registradas en la naturaleza potencialmente peligrosas para los peces de cultivo o por razones zoonóticas

Las pérdidas ocasionadas por la enfermedad del punto blanco, cuyo agente causal es *Ichthyophthirius multifiliis,* son las más graves en los acuarios. Además, Millefanti (1997) cita al nematode *Camallanus cotti* (gusano de cabeza de fresa) como un importante patógeno de charácidos y poecílidos.

Comentario final

El artículo 121 de la Constitución Nacional Argentina establece que recae en las provincias la competencia originaria para la regulación de la acuicultura. En este contexto nueve de las 23 provincias argentinas han generado normativa específica con jerarquía de Ley para el control de la actividad. Entre ellas, las provincias que concentran la mayor producción ictícola, como Neuquén (ley provincial de Acuicultura Nº 1996/93), Río Negro (ley provincial de Acuicultura Nº 2829/94) y Misiones (ley provincial de Acuicultura Nº 3952). Además, la Administración de Parques Nacionales mediante la Resolución 358/90 también establece lineamientos para la instalación de pisciculturas de salmónidos en su jurisdicción.

La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la Nación, considerando la expansión de los cultivos de diferentes especies registradas a partir de la década del `90, generó 3 líneas de acción:

- Diagramó un Programa de Enfermedades de Animales Acuáticos (Res. 021/2001).
- Estableció las pautas para la vigilancia epidemiológica de los establecimientos de cultivo (Res. 422/03).
- Instituyó el marco legal (Res. 1314/04), para regular la actividad en el territorio argentino a través de un Registro Único Nacional de Establecimientos de Acuicultura (RENACUA) que reconoce y habilita a las personas y entes dedicados a la cría y a la comercialización de productos acuícolas.

Considerando el grado de crecimiento que ha experimentado la acuicultura en las últimas décadas y el conocimiento previo de la riqueza de

especies parásitas en poblaciones naturales de peces, es necesario orientar en el futuro las investigaciones parasitológicas en los establecimientos dedicados a la cría y comercialización de peces, especialmente aquellos que utilizan sistemas de cultivo en ambientes naturales. Tales estudios permitirán conocer con mayor certeza el estado sanitario de los recursos acuáticos cultivados, y por lo tanto, generar eficaces políticas de prevención y erradicación de enfermedades parasitarias de alto riesgo.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su sincero agradecimiento a las siguientes personas: Rocío Vega por la diagramación y confección del mapa, Luis Compagnucci, Víctor Baéz, Leonardo Buria y Patricia Noguera por el aporte de datos.

Referencias

ADRIANO, E.; CECCARELLI, P.; CORDEIRO, N. 2002. Prevalencia de parasitos do filo Myxozoa em pacú (*Piaractus mesopotamicus)* (Osteichthyes: Characidae) em ríos do Pantanal Mato-grossense, Brasil. *Bol. Tec. CEPTA*, Pirassununga, 15:31-38.

AHNE, W. 1985. *Argulus foliaceus* L. and *Pisicola geometra* L. as mechanical vectors of spring viremia of carps virus (SVCV). *J. Fish. Dis.*, 8:241-242.

ALKHALIFE, I. S.; HASSAN, R. R.; ABDEL-HAMEED, A. A.; AL-KHAYAL, L. A. 2006. Diphyllobothriasis in Saudi Arabia. *Saudi Med. J.*, 27:1901-1904.

ANDO, K.; ISHIKURA, K.; NAKAKUGI, T.; SHIMONO, Y.; TAMAI, T.; SUGAWA, M.; LIMVIROJ, W.; CHINZEI, Y. 2001. Five cases of *Diphyllobothrium nihonkainse* infection with discovery of plerocercoids from an infective source, *Oncorhynchus masou ishikawae*. *J. Parasitol*., 87:96-100.

ARTHINGTON, A. H.; BÜLHDORN, D. 1996. The effects of species interactions resulting from aquaculture operations. In: BAIRD, D.; BEVERIDGE, M.; NELLY, L.; MUIR, J. (Ed.). *Aquaculture and water resource management*. Oxford: Blackwell Science, p. 114-138.

AURÓ DE OCAMPO, A. 1996. Importancia de los peces de ornato como reservorios de virus patógenos para peces de consumo. *Vet. Méx*., 27: 159-163.

BACIGALUPO, J.; D'ALESSANDRO BACIGALUPO, A. 1952. Difilobotriasis autóctona del perro en la Argentina. *Gac. Vet*., 14:216-222.

BERASAIN, G. E.; VELASCO, C.; COLAUTTI, D. 2001. Experiencias de cultivo intensivo de larvas, juveniles y reproductores de pejerrey *Odontesthes bonariensis*. In: GROSMAN, F. (Ed.). *Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey.* Cap. IV (versión electrónica www.exa.unicen.edu.ar)

BRIZZOLA, S.; TANZOLA, D. 1995. *Hysterothylacium rhamdiae* sp. n., (Ascaridoidea: Anisakidae) from a neotropical catfish, *Rhamdia sapo* (Pisces: Pimelodidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 90:349-352.

CAMPOS, C.; TAKEMOTO, R.; FONSECA, V.; MORAES, F. 2009. Ecology of the parasitic endohelminth community of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Characiformes) from Aquidauana and Miranda Rivers, Pantanal, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Braz. J. Biol*., 69: 87-92.

CARVAJAL, J.; GONZALEZ, L. 1990. Presencia de *Hysterothylacium* sp. (Nematodo: Anisakidae) en salmón Coho de Chiloé cultivado en jaulas. *Rev. Chil. Hist. Nat*., 63:165-168.

CHOU, H. F.; YEN, C. M.; LIANG, W. C.; JONG Y. J. 2006. *Diphyllobothrium latum*: the first child case reporte in Taiwan. *Kaohs. J. Med. Sc*., 22:346-351.

CUSACK, R.; CONE, D. 1986. A review of parasites as vectors of viral and bacterial diseases of fish. *J. Fish. Dis.*, 9:169-171.

DEVI, C.; SHASHIKALA, I.; SRINIVASAN, S.; MURMU, U.; BANUIAN, P.; KANUNGO, R. 2007. A rare case of diphyllobothriasis from Pondecherny (South India). *Indian J. Med. Microbiol.,* 25:152-154.

DOMITROVIC, H.; JACOBO, W.; FERNÁNDEZ, R.; FLORES QUINTANA, C.; ROUX, J. 1991. Myxosporidiosis (*Henneguya* sp.) en el tegumento de *Gymnotus carapus* Linné, 1758 (Pisces, Gymnotidae). *Rev. Vet*., 13: 15-28.

ERICHSEN EMMEL, V.; INAMINE, E.; SECCHI, C.; BRODT, T. C. Z.; AMARO, M. C. O.; CANTARELLI, V. V.; SPALDING, S. 2005. *Diphyllobothrium latum*: case report in Brazil. *Rev. Soc. Brás. Méd. Trop*., 39:82-84.

FERRAZ DE LIMA, C.; FERRAZ DE LIMA, J.; CECCARELLI, P. 1989. Ocorrencia de acantocéfalos parasitando o pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887, (Pisces, Serrasalmidae) em piscicultura. *Bol. Tec. CEPTA*, Pirassununga, 2:43-51.

FERRAZ DE LIMA, C.; CECCARELLI, P.; REIS, N. 1990. Aspectos histopatológicos de acantocefalose em pacú *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Bol. Tec. CEPTA*, Pirassununga, 3: 55-63.

FERRAZ DE LIMA, C.; REIS, N.; CECCARELLI, P.; BOZANO, G. 1995. Modificacoes histológicas associadas com infecao por *Henneguya* sp. (Protozoa, Myxosporidea) em pacú *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Teleostei, Serrasalmidae). *Bol. Tec. CEPTA*, Pirassununga, 8:13-23.

FLORES QUINTANA, C.; ROUX, J.; DOMITROVIC, H.; JACOBO, W. 1992. Myxosporidiosis (*Henneguya* sp.) en branquias de *Serrasalmus* sp. (Pisces, Serrasalmidae). *Rev. Ictiol.,* 1:11-19.

FUSTER DE PLAZA, M. L.; BOSCHI, E. 1957. *Desnutrición y deformaciones vertebrales en pejerreyes de los embalses de Córdoba. Departamento de Investigaciones Pesqueras*. Ministerio de Agricultura y Ganadería.

GARCÍA M., L. J.; OSORIO SARABIA, D.; CONSTANTINO, F. 1993. Prevalencia de los parásitos y las alteraciones histológicas que producen a las tilapias de la laguna de Amela, Tecomán, Colima, Mexico. *Vet. Méx*. 24:199-205.

GARCÍA ROMERO, N. 2001. Alteraciones patológicas del pejerrey (*Odontesthes bonariensis* C.) en ambientes naturales y bajo condiciones de cultivo. In: Grosman, F. (Ed.). *Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey.* Cap. X (versión electrónica www.exa.unicen.edu.ar)

GIL DE PERTIERRA, A. 2002. Redescription of *Proteocephalus bagri* and *P. rhamdiae* (Cestoda: Proteocephalidae) from South America, with comments on morphological variation. *Folia Parasitol*., 49:55-66.

GIL DE PERTIERRA, A.; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, M. 1990. Seasonal dynamics and maturation of the cestote *Proteocephalus jandia* (Woodland, 1933) in the catfish (*Rhamdia sapo*). *Acta Parasitol. Pol*., 35:305-313.

GIL DE PERTIERRA, A.; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, M. 1995. Ocurrencia estacional de *Acanthostomum gnerii* Szidat, 1954 (Acanthostomidae, Acanthostominae) y de dos especies de Derogenidae, Halipeginae, parásitos del bagre sapo, *Rhamdia sapo* Valenciennes, 1840 (Pisces, Pimelodidae) en Argentina. *Rev. Brasil. Biol*., 55:305-314.

GILBERT, V. M.; DEL PONTI, O. D.; TIRANTI, S. I.; DOMA, I. L. 1993. *Dinámica de población de peces del Embalse Casa de Piedra*. Informe de Avance, FCEN-UNLPampa. 19p.

HAMANN, M. 1982. Parásitos del pacú (*Colossoma mitrei*) del río Paraná medio, República Argentina (Pisces, Serrasalmidae). *Hist. Nat*., 2:153-160.

KEIM, A. 1982. *Manual de métodos parasitológicos e histopatológicos en piscicultura*. Montevideo, Uruguay: Instituto Nacional de Pesca. (Informe Técnico). Disponível em: www.fao.org/docrep/field/003/AC566S. Acesso em:

KUBITZA, F. 2004. Coletanea de informacoes aplicadas ao cultivo do tabamquí, do pacú e de outros peixes redondos. Parte 2. *Panor. Acuic.,* 13-23.

LÓPEZ, H.; GARCIA, M. 2001. Aspectos históricos e importancia regional del pejerrey bonaerense. In: GROSMAN, F. (Ed.). *Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey.* Cap. I (versión electrónica www.exa.unicen.edu.ar).

LÓPEZ, H.; MIQUELARENA, A. M.; MENNI, R. C. 2003. Lista comentada de los peces continentales de Argentina. *ProBiota*, p. 90. (Serie Técnica y Didáctica 5).

LUCHINI, L. 2004. Perspectivas en acuicultura : nivel mundial, regional y local. Buenos Aires: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA), Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, Dirección de Acuicultura, 93 p.

LUCHINI L.; AVENDAÑO, T. 1983. Cría de larvas de *Rhamdia sapo* (Val.) Eig. en estanques. Primeros ensayos. *Rev. Asoc. Cs. Nat. Litoral.,* 14:79-86.

LUCHINI, L.; AVENDAÑO, T. 1985. Primer alevinaje de bagre sudamericano, *Rhamdia sapo* (Val.) Eig. en condiciones controladas. *Rev. Asoc. Cs. Nat. Lit.,* 16:137-147.

LUCHINI, L.; PANNÉ HUIDOBRO, S. 2008. Perspectivas en acuicultura: nivel mundial, regional y local. [Buenos Aires]: Dirección de Acuicultura, Subsecretaría de Pesca y Acuicultura. Disponível em: http://www.sagpya.mecon.gov.ar/SAGPyA/pesca/acuicultura/06_Noticias/_archivos/081110_Perspectivasenacuicultura(nivelmundial,regionaly local).pdf. Acesso em:

LUCHINI, L.; QUIRÓS, R.; AVENDAÑO, T. 1984. Cultivo del pejerrey (*Basilichthys bonariensis*) en estanques. *Mem. Asoc. Lat. Acuicult.*, 5:581-587.

LUNASCHI, L. 1988. Heminthos parásitos de peces de agua dulce de la Argentina X. Tres nuevas especies del género *Thometrema* Amato, 1968 (Trematoda-Derogenidae). *Neotrop.*, 34:23-32.

MACCHI, P. 2004. *Respuestas de* Galaxias maculatus *a la depredación por* Percichthys trucha *y los salmónidos introducidos en ambientes lénticos de la Patagonia norte.* 175 f. Tesis (Doctoral) – Universidad Nacional del Comahue, Bariloche.

MAC DONAGH, E. J. 1928. Estudio preliminar de la ecología del pejerrey en las lagunas del Monte y Cochicó (Guaminí). Dirección General de Higiene de la Provincia de Buenos Aires. Instituto Bacteriológico. *An.Of. Quím.*, I:3-40.

MANCINI, M.; BUCCO, C.; SALINAS, V.; LARRIESTRA, A.; TANZOLA, R.; GUAGLIARDO, S. 2008. Seasonal variation of parasitism in pejerey *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes, Atherinopsidae) from La Viña reservoir (Córdoba, Argentina). *Rev. Bras. Parasit. Vet*., 17:28-32.

MARGOLIS, L.; KENT, M. L.; BUSTOS, P. 1996. Diseases of salmonids reseambling myxosporean whirling disease, and the absence of *Myxosoma cerebralis*, in South America. *Dis. Aquat. Org.*, 25:33-37.

MARTINS, M.; SOUZA, V.; MORAES, J.; MORAES, F.; COSTA, A. 1999. Comparative evaluation of the susceptibility of cultivated fishes to the natural infection with myxosporidean parasites ant tissue changes in the host. *Rev. Bras. Biol.,* 59:263-269.

MARTINS, M.; MORAES, F.; FUJIMOTO, R.; OSAKA, E.; NOMBRA, D.; SILVA, C.; SCHALCH, S. 2000. Parasitic infections in cultivated freshwater fishes: a survey of diagnosticated cases from 1993 to 1998. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.,* 9:23-28.

MARTORELLI, S. R. 1986. Estudios parasitológicos en biotopos lenticos de la R. Argentina. II: el ciclo biológico de *Homalometron pseudopallidum* sp. nov. (Digeneo) parásito de *Gymnogeophagus australis* (Eigenmann, 1907) (Pisces: Cichlidae). *Neotropica*, 32:3-12.

MILLEFANTI, M. 1997. *Las enfermedades de los peces de acuario*. Barcelona: Ed.De Vecchi.

MIRANDA, A. F. 2002. *Estudio preliminar de los sistemas parasitarios en peces de la laguna de Los Padres (Partido de General Pueyrredón, Provincia de Buenos Aires).* 105 f. Tesis (Licenciatura) – FCEyN, Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata.

MORAVEC, F.; URAWA, S.; CORIA, C. O. 1997. *Hysterothylacium patagonense* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from freshwater fishes in Patagonia, Argentina, with a key to the species of *Hysterothylacium* in American freshwater fishes. *Syst*. *Parasitol*., 36:31-38.

ORTUBAY, S.; SEMENAS, L.; ÚBEDA, C.; QUAGGIOTTO, E.; VIOZZI, G. 1994. *Catálogo de peces dulceacuícolas de la Patagonia argentina y sus parásitos metazoos*. Viedma, Río Negro, Argentina: Dirección de Pesca. Subsecretaría de Recursos Naturales. 110 p.

OSTROWSKI DE NÚÑEZ, M. 1977. El ciclo biológico de *Diplostomum (Austrodiplostomum) compactum* (Lutz 1928) Dubois 1970 (= *Austrodiplostomum mordax* Szidat y Nani 1951). *Rev. Museo Arg. Cs. Nat. Bernardino Rivadavia, Parasitol.,* 2:1–63.

OSTROWSKI DE NÚÑEZ, M.; GIL DE PERTIERRA, A. 1991. The life history of *Acanthostomum gnerii* Szidat, 1954 (Trematoda: Acanthostomatidae), from the Catfish *Rhamdia sapo* in Argentina. *Zool. Anz,* 227:58-71.

OSTROWSKI DE NÚÑEZ, M.; SEMENAS, L.; BRUGNI, N.; VIOZZI, G.; FLORES, V. 1999. Redescription of *Acanthostomoides apophalliformis* (Trematoda, Acanthostomidae) from *Percichthys trucha* (Pisces, Percichthyidae) with notes on its life cycle in Patagonia, Argentina. *Acta Parasitol*., 44:222-228.

PANNÉ HUIDOBRO, S.; LUCHINI, L. 2008. *Panorama actual del comercio internacional de peces ornamentales*. Buenos Aires: Dirección de Acuicultura, SAGPyA, 27 p.

PAPERNA, I. 1996. *Parasites, infections and diseases of fishes in Africa. An update.* Rome: FAO, 220 p. (CIFA Technical Paper n° 31).

PEDUZZI, R. 1992. Résurgence du bothriocéphale (*Diphyllobothrium latum*) au Tessin, situation en Suisse et en Italie du Nord. *Congr. Annu. Soc. Suisse Med. Trop. Parasitol*., 5-7.

PÉREZ, J. E.; MUÑOZ, C.; HUAQUIN, L.; NIRCHIO, M. 2004. Riesgos de la introducción de tilapias (*Oreochromis* sp.)(Perciformes: Cichlidae) en ecosistemas acuáticos de Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat*., 77:195-199.

PRIETO, A. B.; DEL VALLE, A. E. 1996. *La salmonicultura en Neuquén y Río Negro*. Junín De Los Andes, Neuquén: CEAN/JICA.

RAUQUE, C.; VIOZZI, G.; SEMENAS, L. 2003. Component population study of *Acanthocephalus tumescens* (Acanthocephala) in fishes from lake Moreno (Argentina) and status of the different host species. *Folia Parasitol*., 50:66-72.

REVENGA, J. E. 1993. *Diphyllobothrium dendriticum* and *Diphyllobothrium latum* in fishes from Southern Argentina: Association, abundance, distribution, pathological effects, and risk of human infection. *J. Parasitol.,* 79:379-383.

REVENGA, J. E.; SEMENAS, L. 1991. Difilobotriasis en salmónidos introducidos en el Parque y Reserva Nacional Nahuel Huapi, Argentina: Morfología de plerocercoides. *Arch. Med. Vet*., 23:157-164.

RINGUELET, R. A. 1943. *Piscicultura del pejerrey o atherinicultura*. [S.l.]: Ed. Suelo Argentino. Col. Agro (6), 162p.

ROMANO, L. A.; SCHULDT, M. 1984. Alteraciones morfológicas asimilables a la enfermedad del torneo en la trucha arco iris *Salmo gairdneri* Richardson (Piscis: Salmonidae). *Neotróp.*, 30:87-88.

ROSSI, F.; LUCHINI, L. 2007. Cultivo del "Randiá" (*Rhamdia quelen*) para fomento de su producción comercial, en clima templado-cálido. In: SUBSECRETARÍA DE PESCA Y ACUICULTURA (Ed.). *Serie Pesca y Acuicultura: Estudios e investigaciones aplicadas Nº 2*. Buenos Aires: SAGPyA, p. 1-37.

SALGADO-MALDONADO, G.; PINEDA-LÓPEZ, R.; GARCÍA-MAGAÑA, L.; LÓPEZ-GIMENEZ, S.; VIDAL-MARTÍNEZ, V.; AGUIRRE-MACEDO, L. 2005. Helmintos parásitos de peces dulceacuícolas. In: BUENO, J.; ALVAREZ, F.; SANTIAGO, S. (Ed.). *Biodiversidad del estado de Tabasco.* México: Universidad Autónoma de México, CONABIO, p. 145-166.

SÁNCHEZ, S.; SANTINÓN, J. J.; HERNÁNDEZ D. R.; ROUX, J. P.; DOMITROVIC, H. A. 2008. Cría de bagre sudamericano (*Rhamdia quelen*) en estanques luego de diferentes períodos de retención del crecimiento a tres densidades de siembra. *REDVET Revista Electrónica de Veterinaria*, 9(4). Disponível em: www.veterinaria.org/revistas/redvet/ n040408/ 040801.pdf. Acesso em:

SCHEINERT, P. 1998. *Estado sanitario de la ictiofauna del Embalse de Piedra del Aguila*: Informe final de la campaña febrero-diciembre 1997. Bariloche: Departamento de Acuicultura, Cátedra de Ictiopatología, Centro Regional Universitario Bariloche, 10 p.

SEMENAS, L. 1997. Enfermedades parasitarias en cría artificial de peces. In: SEIJO, A.; LARGHI, O.; ESPINOSA, M.; RIVAS, M.; SABATTINI, L. (Ed.). *Temas de Zoonosis y Enfermedades Emergentes*. Buenos Aires: Asociación Argentina de Zoonosis, p. 89-92.

SEMENAS, L. 1998. Primer registro de diplostomiasis ocular en trucha arco iris cultivada en Patagonia (Argentina). *Arch. Med. Vet*., 30:165-170.

SEMENAS, L. 2006. *Diphyllobothrium* spp. In: BASUALDO, J.; COTO, C.; TORRES, R. de (Ed.). *Microbiología biomédica.* 2. ed. Buenos Aires: Editorial Atlante, p. 1269-1274.

SEMENAS, L.; KREITER, A. 1995. Epidemiología de la difilobotriasis en la Región Andino Patagónica. *Rev. Asoc. Bioq. Arg.,* 59:203-206.

SEMENAS, L.; ÚBEDA, C. 1997. Difilobotriasis humana en la Patagonia argentina. *Rev. Saúde Pub.,* 31:302-307.

SEMENAS, L.; ÚBEDA, C.; ORTUBAY, S.; NOGUERA, P.; REVENGA, J.; VIOZZI, G. 1989. Estado Sanitario de las poblaciones de peces de cuerpos de agua andino-patagónicos. Actas Primeras Jornadas Nacionales de Fauna Silvestre. Universidad Nacional de La Pampa. Gobierno de La Pampa, II:329-347.

SEMENAS, L.; ORTUBAY, S.; UBEDA, C. 1994. Presencia de gloquidios de *Diplodon chilensis* Haas 1931 (Mollusca, Pelecypoda) en peces dulceacuícolas patagónicos. *Bol. Chil. Parasitol*., 49:85-86.

SEMENAS, L.; KREITER, A.; URBANSKI, A. 1997. Difilobotriasis humana en la Patagonia, Argentina. *Rev. Saúde Púb.,* 31:302-307.

SHIMAZU, T.; URAWA, S.; CORIA, C. O. 2000. Four species of digeneans, including *Allocreadium patagonicum* sp. n. (Allocreadiidae), from freshwater fishes of Patagonia, Argentina. *Folia Parasitol.,* 47:111-117.

STADLBAUER, V.; HABERL, R.; LANGNER, C.; KREJS, G. C.; EHERER, A. 2005. Annoying vacation souvenir: Fish tapeworm (*Diphyllobothrium* sp.) infestation in an Austrian fisherman. *Wien Klin. Woch.,* 117:776-779.

STRÜSSMANN, C. A. 1989. Basic studies on seed production of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. 351 f. Tesis (Doctoral) – Tokyo University of Fisheries, Tokyo.

SURIANO, D. M. 1983. *Demidospermus anus* gen.nov. sp. nov. (Monogenea: Ancyrocephalinae) parásita branquial de Loricaria (L.) anus Valenciennes, 1840 (Pisces: Loricariidae) de la Laguna de Chascomús, Provincia de buenos Aires, República Argentina. *Neotropica*, 29:111-119.

SURIANO, D. M. 1986. El género *Urocleidoides* Mizelle y Price, 1964 (Monogenea: Ancyrocephalidae). Anatomía y posición sistemática. *Urocelidoides mastigatus* sp.nov. y *U. travassosi* (Price, 1934) Molnar, Hanek y Fernando, 1974 parásitas de *Rhamdia sapo* (Valenciennes, 1840) Eigenmann y Eigenmann, 1888 y *Pimelodella laticeps* Eigenmann, 1917 (Pisces: Siluriformes) de la Laguna de Chascomús, República Argentina. *Physis Secc. B*, 44:73-80.

SURIANO, D. M. 1989. Population biology of *Philocorydoras platensis* Suriano, 1986 (Monogenea: Ancyrocephalidae) from *Corydoras paleatus* (Jenyns) (Pisces: Callichthydae) in Laguna Chascomús, República Argentina. *Rev. Ib. Parasitol*., 49:11–18.

SZIDAT, L. 1964. Vergleichende helminthologische untersuchungen an den Argentinischen grossmöwen *Larus marinus dominicanus* Lichtenstein und

Larus ribidundus maculipennis Lichtenstein nebst neven beabachtungen über die artbildung Bel parasiten. *Z. Parasitenkd.*, 24:351-414.

SZIDAT, L.; NANI, A. 1951. Diplostomiasis cerebralis del pejerrey. Una grave epizootia que afecta a la economía nacional producida por larvas de trematodes que destruyen el cerebro de los pejerreyes. *Rev. Inst. Nac. Inv.Cs. Nat. Museo Arg. Cs. Nat. "Bernardino Rivadavia*", *ciencias zoológicas*, 1:324-383.

SZIDAT, L.; SORIA, M. F. 1952. Difilobotriasis en nuestro país. Nota preliminar. *Pren. Méd. Arg.,* 39:77-78.

SZIDAT, L.; SORIA, M. F. 1957. Difilobotriasis en nuestro pais. Sobre una nueva especie de *Sparganum*, parásita de salmones, y de *Diphyllobothrium*, parásita de gaviotas, del lago Nahuel Huapi. *Bol. Mus. Arg. Cienc. Nat*., 9:1-22.

TANZOLA, R. D.; VANOTTI, D. 2008. Primer registro del género *Spironucleus* (Diplomonadida: Hexamitidae) en un pez neotropical. *BioScriba*, 1:73-75.

TANZOLA, R. D.; GUAGLIARDO, S.; ROMERO, A.; SCHWERDT, C.; SCHWERDT, M.; GALEANO, N. 2009. Diversidad parasitaria en peces de agua dulce del sudoeste de la provincia de Buenos Aires. In: CAZZANIGA N.; ARELOVICH, H. M. (Ed.). *Ambientes y recursos naturales del sudoeste bonaerense: Producción, contaminación y conservación*. Bahía Blanca, Argentina: Ed. Ediuns, p. 381–394. Actas de las V Jornadas Interdisciplinarias del Sudoeste Bonaerense.

TAVARES, L. E. R.; LUQUE, J. L.; BOMFIM, C. B. do. 2005. Human diphyllobothriasis: reports from Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Brás. Méd. Vet*., 14:85-87.

TERRAMOCCI, R.; PAGANI, L.; BRUNATI, P.; GATTI, S.; BERNUZZI, A. M.; SCAGLIA, M. 2001. Reappearance of human Diphyllobothriasis in a limited area of lake Como, Italia. *Infec*., 29:93-95.

TORRES, P.; LÓPEZ, J. C.; CUBILLOS, V.; LOBOS, C.; SILVA, R. 2002. Visceral diphyllobothriosis in a cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Chille. *J. Fish Dis.,* 25:375-379.

TREJO, A. R. 1992. A comparative study of the host-parasite relationship of *Pomphorhynchus patagonicus* (Acanathocephala) in two species of fish from Lake Rosario (Chubut, Argentina). *J. Parasitol*., 78:711-715.

TREJO, A. R. 1994. Observations on the host specificity of *Pomphorhynchus patagonicus* (Acanthocephala) from the Alicura reservoir (Patagonia, Argentina). *J. Parasitol.,* 80:829-830.

TULIAN, E. A. 1908. Breve resumen de los trabajos efectuados por la Dirección de Piscicultura durante el período comprendido desde el 1º de abril hasta el 31 de octubre de 1907. *Bol. Min. Agric.*, 9:64-67.

VANOTTI, M. D.; TANZOLA, D. 2005. Relación entre la carga parasitaria total y algunos parámetros hematológicos de *Rhamdia sapo* Val. (Pisces) en condiciones naturales. *Biología Acuática*, 22:247-256.

VIOZZI, G.; BRUGNI, N. 2001. Infección en peces por larvas de *Diplodon chilensis* (Mollusca-Hyriidae). Relación parasitaria y distribución en lagos de la Patagonia Argentina. *Neotróp*., 47:3-12.

VIOZZI, G.; SEMENAS, L.; BRUGNI, N.; FLORES, V. 2009. Metazoan parasites of *Galaxias maculatus* (Osmeriformes: Galaxiidae) from Argentinean Patagonia. *Comp. Parasitol*., 76:en prensa.

VON BONSDORFF, B. 1977. *Diphyllobothriasis in man*. New York: Academic Press.

WICHT, B.; MARJAL, F. de; GOTTSTEIN, B.; PEDUZZI, R. 2008. Imported diphyllobothriasis in Switzerland: Molecular evidence of *Diphyllobothrium dendriticum* (Nitzsch, 1824). *Parasitol. Res.*, 102:201-204.

WICKI, G. 2005. Visión general del sector acuícola nacional- Argentina. [Buenos Aires]: FAO, Fisheries and Aquaculture Department. Disponível em: www.fao.org/fishery/countrysector/naso_argentina/es. Acesso em:

WICKI, G.; MARTÍNEZ, M.; WILTCHIENSKY, E.; MAIZELS, S.; PANNÉ, H.; LUCHINI, L. 1998. Ensayo de producción de camarón de agua dulce (*Macrobrachium rosenbergii*, Palaemonidae) y pacú (*Piaractus mesopotamicus*, Characidae). *Nat. Neotrop.*, 29:69-73.

WICKI, G.; ROSSI, F.; PANNÉ, S.; LUCHINI, L. 2007. Cultivo intensivo del "Ramdiá" (*Rhamdia quelen*) en jaulas suspendidas en estanques, con empleo de diferentes raciones balanceadas y distinta elaboración. In: SUBSECRETARÍA DE PESCA Y ACUICULTURA (Ed.). *Serie Pesca y Acuicultura: Estudios e investigaciones aplicadas Nº 2.* Buenos Aires: SAGPyA, p. 39-64.

WOO, P. T. K.; POYNTON, S. L. 1995. Diplomonadida, Kinetoplastida and Amoebida (Phylum Sarcomastigophora). In: WOO, P. T. K. (Ed.). *Fish diseases and disorders*, *Vol I: Protozoan and Metazoan infections*. Cambridge: CAB International, p. 27-96.

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 19

Metazoan and protozoan parasites of freshwater ornamental fish from Brazil

Marcos Tavares-Dias, Jefferson Raphael Gonzaga Lemos, Maurício Laterça Martins & Gabriela Tomas Jerônimo

Resumo

Anualmente, 27 milhões de peixes ornamentais de água doce são exportados do Brasil para o comércio internacional, principalmente para os Estados Unidos e Europa. A maioria destes peixes é proveniente da bacia amazônica, principalmente dos estados do Amazonas (25 milhões/ano) e Pará (1 milhão/ano) e somente uma pequena parte destes peixes é originária de cultivo. Dezenas de espécies são exportadas do Brasil, sendo Paracheirodon axelrodi (18 milhões/ano) a principal espécie, seguido por Otocinclus affinis (1,4 milhões/ano), Hemigrammus bleheri (1,1 milhões/ano) e Paracheirodon simulans (0,88 milhões/ano). Peixes ornamentais exportados do Brasil apresentam parasitos normalmente também encontrados em hospedeiros de outros países. Infecções parasitárias representam importante desafio para produtores de peixes ornamentais. Neste sentido, baixo número de parasitos pode evoluir para número indesejável e perigoso comprometendo a saúde do peixe.

Abstract

Annually, 27 million of freshwater ornamental fish have been exported from Brazil for international trade, mainly to the United States and Europe. Most of these fish are originated from Amazonian basin, especially from the states of Amazonas (25.0 million/year) and Pará (1.0 million/year). Small quantity of these fish is from culture. Paracheirodon axelrodi (18 million/year) is the main fish exported, followed by Otocinclus affinis (1.4 million/year), Hemigrammus bleheri (1.1 million/year) and Paracheirodon simulans (0.88 million/year). Ornamental fish exported from Brazil have parasites that are also reported in hosts from the other countries. Parasitic infections represent an important challenge for commercial suppliers of ornamental fish. On this view, low number of parasites may evolve to undesirable and dangerous number compromising the fish health.

Introduction

The ornamental fish hobbyist has experienced an increase in world popularity since the 1990s. This hobby is a multi-million dollar industry, and the United States of America is considered the largest market for ornamental organisms. Hence, increased demand for ornamental fish by the aquarists from the United States of America, United Kingdom, Japan, Germany, Italy and Belgium has been responsible for development of the activity. Over the last ten years the value of global exports of ornamental fish has averaged over US$ 183 million/year (Prang, 2007). Nowadays, most of the ornamental fish are produced in captivity (90%), and only 10% is wild fish. The world's ornamental fish is growing due to the production and importation of several species from different continents especially from Asia and South America.

Singapore is the principal ornamental fish exporter over the world (Prang, 2007; Ribeiro, 2008). However, a great number of aquarium fish are from the Amazonian Basin (Brazil, Colombia and Peru) in which is an important source of economic resources. Colombia is the largest exporter of South America, with exportation of 25 million of ornamental fish/year, generating an income of US$ 7 million (Ribeiro, 2008). Since 2006, Brazil has exported about 28 million of freshwater ornamental fish/year, which generated an income of about US$ 6 million/year (Figure 1). Ornamental fish are collected in eight Brazilian States. However, only the Amazonas State contributes with 64.0% of export production and Pará State with 26.0% (Figure 2). Part of freshwater ornamental fish exported from Pará State is collected in Amapá State. Nevertheless, the quantity of fish species collected in Amapá is still ignored by the Brazilian government that controls the exploration of ornamental fish.

Ornamental fish from Amazonas State are exported to Germany, Netherlands, France, Belgium, UK and USA (Prang, 2007). Since 2006, Amazonas has exported 25.2 million fish/year with an income of US$ 3.7 million/year (Figure 2). However, the potential of exportation of freshwater ornamental fish is probably much higher than that currently practiced in the Brazilian Amazonia (Prang, 2007).

Selection of fish species is a result of demand for fish highly colorful must be maintained when fed in aquarium. The last point is the choice of imported fish species. Ornamental fish exported from Amazonas State belong to 25 families with 130-140 fish species highly colorful (Table 1). The main fish species are shown in Table 1. There are 800 species documented for Rio Negro basin (Chao et al., 2001), but only 70 fish species from the basin are currently permitted for exportation (Prang, 2007). Barcelos Municipality is responsible for 67.8% ornamental fish exported from the Amazonas State (Chao et al., 2001). This basin is the largest area of ornamental fish capture and *Paracheirodon axelrodi* represents 70.0% of the total exported fish (Table 1). Other important species include the marbled hatchetfish *Carnigiella strigata*, blackwing hatchetfish *C. martae*, brown pencilfish *Nannostomus eques*, oneline pencilfish *Nannostomus unifasciatus*, Loricariid *Ancistrus hoplogenys*, rosy tetra *Hyphessobrycon copelandi*, catfish *Dianema urostriatum*, dwarf sucker *Otocinclus* sp., *Apistogramma* sp., angelfish *Pterophyllum scalare*, discus *Symphysodon* sp., *Hemigrammus microstomus* and catfishes *Corydoras* sp.

Water level oscillations in the Amazonia can affect the habitat and ecological aspects such as food supply and reproduction of ornamental fish population. In the Amazonas State, capture of ornamental fish in flooded forest ("igapós") and water small streams ("igarapés") is strongly influenced by seasonality that occurs from August through February (Figure 1). After capture, fish are transported to Manaus (AM) where they are kept in fattening/quarantine tanks of exporter's holding facilities until their exportation in which depending on the species, can take from 60 days to one year. Prophylaxis and management control must be considered during this time in order to avoid economical losses due to pathogens action.

The monitoring of fish health status must be one of the most important activities in culture and exportation's holding facilities of fish. Studies are carried out after exportation of catfishes *Corydoras* sp. and *Brochis splendens* from Brazil to England. Dinoflagellate *Piscinoodinium pilullare* was detected before exportation (Ferraz & Sommerville, 1998). Procedures to avoid risks of infection or transfer of disease and parasites must be carried out. Ornamental fish exportation has been responsible for introduction of parasites (Sterud & Jorgensen, 2006) that can endanger native population and culture (Mouton et al., 2001; Kim et al., 2002), specially when the prophylactic management and quarantine are ignored. When parasites are introduced into the environment they can persist due to favorable physical and chemical water conditions.
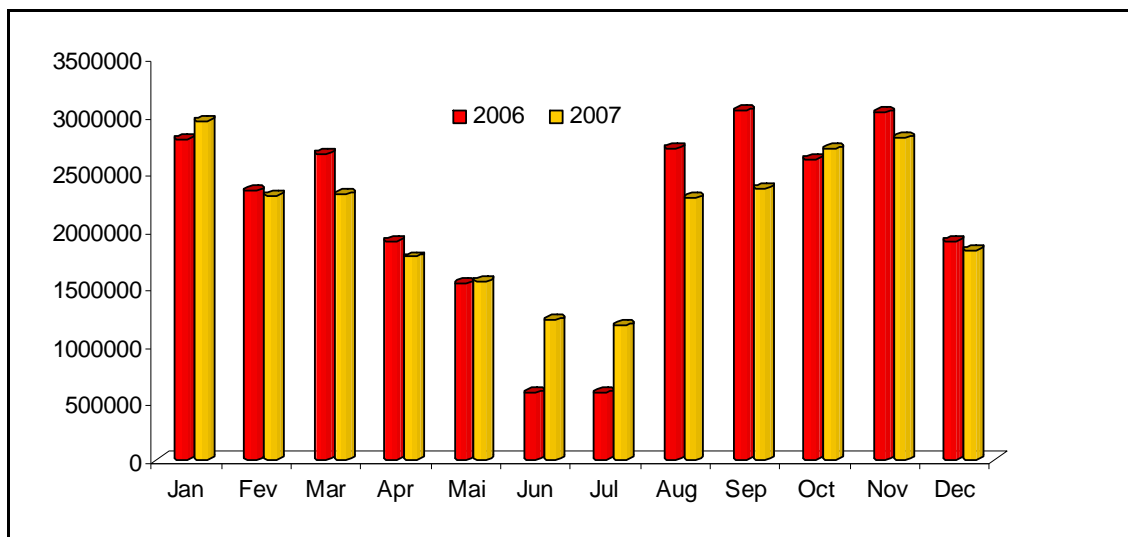
Figure 1. Number of freshwater ornamental fish exported from Brazil during the period of 2006 and 2007 (Ibama, 2008).
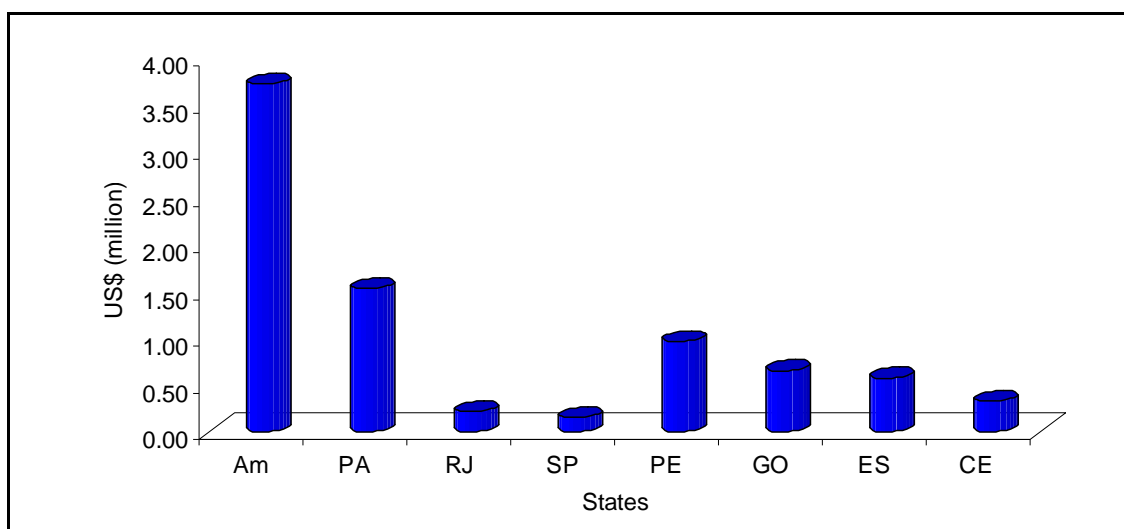
Figure 2. Exportation values of freshwater ornamental fish from the Brazilian States in the year 2007 (Ibama, 2008). Am: Amazonas, PA: Pará, RJ: Rio de Janeiro, SP: São Paulo, PE: Pernambuco, GO: Goiás, ES: Espírito Santo, CE: Ceará.

Table 1. Principal freshwater ornamental fish species exported from the Amazonas State, Brazil in 2007 (Ibama, 2008).

Fish species	Common name	Number of fish exported
Paracheirodon axelrodi	Cardinal tetra	17.783.580
Otocinclus affinis	Golden otocinclus	1.437.978
Hemigrammus bleheri	Firehead tetra	1.180.312
Paracheirodon simulans	Green neon	844.160
Otocinclus vittatus	Dwarf sucker	682.192
Corydoras schwartzi	Schwartz's catfish	525.938
Hyphessobrycon sp.	Rosy tetra	437.500
Carnegiella strigata	Marbled hatchetfish	360.184
Corydoras julii	Leopard corydoras	162.035
Corydoras hastatus	Dwarf corydoras	152.300
Corydoras punctatus	Spotfin corydoras	151.778
Corydoras agassizii	Catfish corydoras	138.283
Nannostomus marginatus	Dwarf pencilfish	134.071
Dicrossus maculatus	Dwarf cichlid	101.180
Corydoras elegans	Elegant corydoras	81.136
Corydoras adolfoi	Adolf's catfish	81.069
Nannostomus trifasciatus	Threestripe pencilfish	75.388
Baryancistrus sp.	Loricariid catfish	74.098
Ancistrus spp.	Loricariid catfish	64.452

Ornamental fish parasites from rivers at the Brazilian Amazonia

A great quantity of good quality fish exported is the challenge to aquarium industry. Higher mortality has been registered from capture and transport of ornamental fish induced by stress (Waichman et al., 2001). Not only good water quality but also adequate handlings are practices that must be adapted for the activity.

Water quality monitoring to reduce stress and fish mortality is the main factor to be thought. Low water quality observed during transport and the lack of basic care result in reduced fish health status (Waichman et al., 2001). The introduction of ornamental fish without quarantine can cause trouble for importation country with consequent economic losses (Kim et al., 2002).

Parasitism in fish occurs normally in the native environment in a great diversity of parasites comparing to cultured fish (Moraes & Martins, 2004). Fish in the nature inhabit with parasites successfully (Roberts, 1981) by the fact that nutritional and physiological aspects are maintained (Andrade et al., 2001). When fish are exposed to different conditions the relation host/parasite/environment is broken especially due to water quality, stocking density and other stressor effects (Molnár, 1994; Moraes & Martins, 2004). Thus, it is important to study the causative agents of disease in ornamental fish (Martins et al., 2001). To success of fish transport the environment must be free of noxious factors that may cause a decrease in fish resistance. It is necessary to evaluate the main factors responsible for compromise the activity.

Up to now, in Brazilian Amazonia, only 54 parasite species of seven zoological groups are known (Figure 3). These parasites have been reported, mainly, in fish species of the genera *Ancistrus* (Matos et al., 1998; Thatcher, 2006), *Carnegiella*, *Corydoras, Hemigrammus*, *Hyphessobrycon*, *Poecilia*, *Xiphophorus*, *Carassis auratus, Astronotus ocellatus* (Thatcher, 2006) and *Gasteropelecus sternicla* (São Clemente et al., 2000). However, as has a great number of Amazon ornamental fish species known and only some few fish were studied, hence many parasites species must be described yet.

Studies on *P. axelrodi*, *S. discus*, *H. erythrostigma*, *Ancistrus* sp., *Corydoras robinae*, *C. burguessi* and *C. adolfoi* from the Barcelos area, Negro River basin before they were sent to the exporters in Manaus (Amazonas State, Brazil), have registered the occurrence of protozoans *Chilodonella* sp., *Trichodina* sp. and *Piscinoodinium pilullare,* Monogenoidea and bacteria (Ferraz, 1999). In general, these occurrences of multiple parasitic infections are associated to inadequate handling, poor water quality, and high stocking density during the transport, as well as long periods of time without feeding. This knowledge is important to avoid alterations on fishe’s health status, since a diagnosis of an epidemiological and sanitary situations are necessary to avoid the dissemination of parasites to other municipalities.
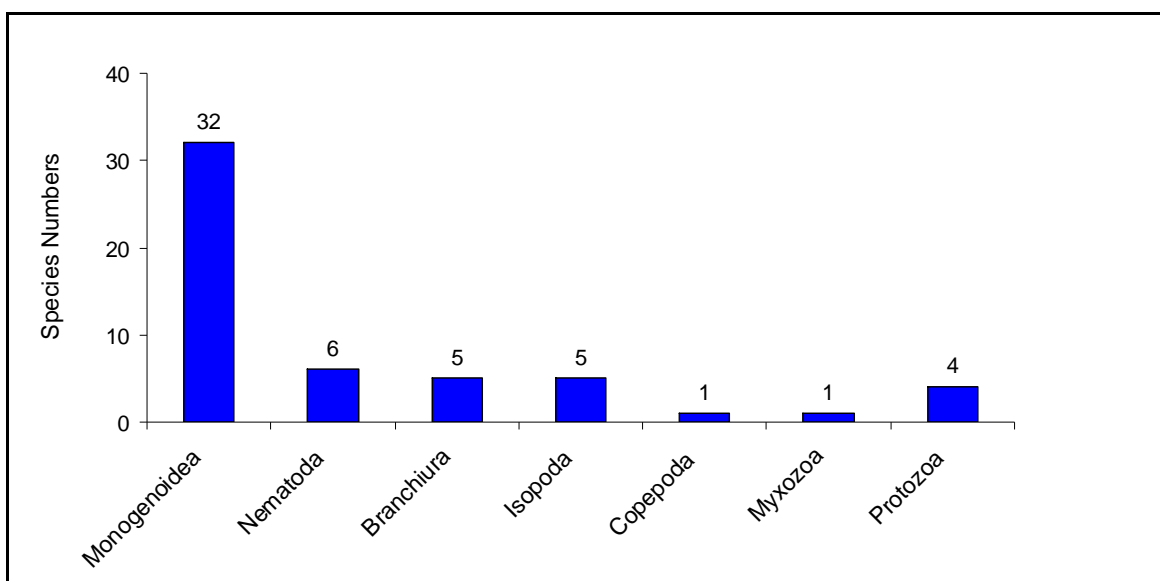
Figure 3. Number of parasite species described in ornamental fish species from Brazilian Amazonia

Parasites in five ornamental fish species kept in exporter's holding facilities from Amazonas State

Specimens of *Dianema urostriatum* (6.5 ± 1.3 cm and 6.0 ± 2.0 g), *Hyphessobrycon copelandi* (3.0 ± 0.7 cm and 0.7 ± 0.5 g), *Otocinclus* sp. (3.3 ± 0.5 cm and 0.9 ± 0.6 g), *Apistogramma* sp. (3.4 ± 0.5 cm and 0.9 ± 0.4 g) and *Paracheirodon axelrodi* (2.5 ± 0.2 cm and 0.3 ± 0.1 g) were collected from tanks of an exporter from Manaus municipality, Amazonas State, Brazil.

In this chapter, we assumed that mean relative dominance is the total number of parasites of each species divided by total number of parasites of all parasite species found (Rhode et al., 1995), prevalence is the number of parasitized fish divided by examined fish.100, and the mean intensity of infection is the total number of each parasite divided by parasitized fish (Bush et al., 1997).

These fish were kept in a density of 3,500 fish/m^3 and feed twice a day with an ornamental fish prepared ration containing 36.0% of crude protein. Upon their arrival at the exporter, the fish were submitted to treatments prophylactic with formalin and tetracycline. Moreover, fish were fed with a ration containing ivermectin. Every seven days a prophylaxis with these chemotherapeutants was carried out in the tanks. Fish that had arrived at the exporter and fish that maintained in tanks for seven days up to one year were treated.

Physical-chemistry parameters of water quality from the exporter's holding facilities tanks from Manaus (AM) are shown on Figure 4. The

reported values are within the acceptable range for tropical fish health maintenance and production.

From a total of 218 fish submitted to necropsy, parasites were found in 132 (60.5%). In *D. urostriatum*, *P. axelrodi*, *H. copelandi*, *Otocinclus* sp. and *Apistogramma* sp., parasite prevalence was 60.5%, with the of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet 1876, *Trichodina* Ehrenberg, 1838, *Henneguya* Thelohan, 1892, *Piscinoodinium pilullare* (Shäperclaus, 1954) Lom, 1981, Monogenoidea, Nematoda adult, Nematoda larvae, Digenea adult, Digenea metacercariae and Hirudinea *Placobdella* Blanchard 1893 (Table 2).

Prevalence and intensity of *I. multifiliis* on the gills of *P. axelrodi*, *H. copelandi* and *D. urostriatum* were similar, but was not found in *Otocinclus* sp. and *Apistogramma* sp. (Table 3). Dinoflagellate *P. pilullare* (called as velvet disease) was only observed on the gills of *P. axelrodi* and *H. copelandi* (Table 4), whereas *Trichodina* sp. varied from 2 to 30 parasites per host in *Otocinclus* sp (Table 5).

Monogenoidea parasites were present in all species with the lowest prevalence in *Apistogramma* sp. and the highest in *P. axelrodi* and *D. urostriatum*. However, *H. copelandi* and *Apistogramma* sp showed the lowest mean intensity of gill parasites (Table 6). The mean intensity of Monogenoidea was higher in *D. urostriatum* (8.2) and *Otocinclus* sp. (11.5) than that related in the other fish species (Table 6).

The lowest prevalence and intensity of adults Nematoda were observed in the intestines of *D. urostriatum* and the highest in *P. axelrodi* and *Apistogramma* sp. (Table 7). In addition, nematode larvae were also found in the intestines of *H. copelandi* (23.6%), *D. urostriatum* (3.3%) and *P. axelrodi* (10%), but in a few number varying from 1 to 6 helminths per host.

Similar prevalence and intensity of Digenea adults were observed in the intestines of *H. copelandi* and *Otocinclus* sp., whereas the lowest prevalence was found in *P. axelrodi.* These parasites were not found in *D. urostriatum* and *Apistogramma* sp. (Table 8). Metacercariae of Digenea was also observed in the gills of 8.0% of *H. copelandi* and 3.0% of *Apistogramma* sp. Twenty cysts of *Henneguya* sp. were found in the gills of a single specimen of *D. urostriatum*. Leeches of the genus *Placobdella* was found at 3.3% prevalence and one parasite per host on the body surface.

Relative condition factor of parasitized and non-parasitized fish did not show significant difference ($p>0.05$). There was also no significant correlation ($p>0.05$) between parasites intensity and Kn. Hence, these rates of parasites infections load did not compromise the fish health.

In summary, the most dominant parasite taxon was Monogenoidea followed by Nematoda. *Hyphessobrycon copelandi* was the host with the greatest parasite diversity while *Apistogramma* sp. was host with the smallest parasite diversity. Three days after the arrival of fish at the exporter they are weekly submitted to treatment with formalin and tetracycline. This procedure is done specially with *P. axeroldi*, the most exported species, which sometimes is kept in tanks up to one year in order to acquire a bigger corporal size and consequently, a better price in external markets. High prevalence of parasitism was found in fish species of exporter's holding facilities. However, the low mean intensity of parasites was influenced by

chemotherapeutants and prophylactic management. Therefore, the concern with treatment and prophylaxis are of extreme importance for ornamental fish aquaculture.
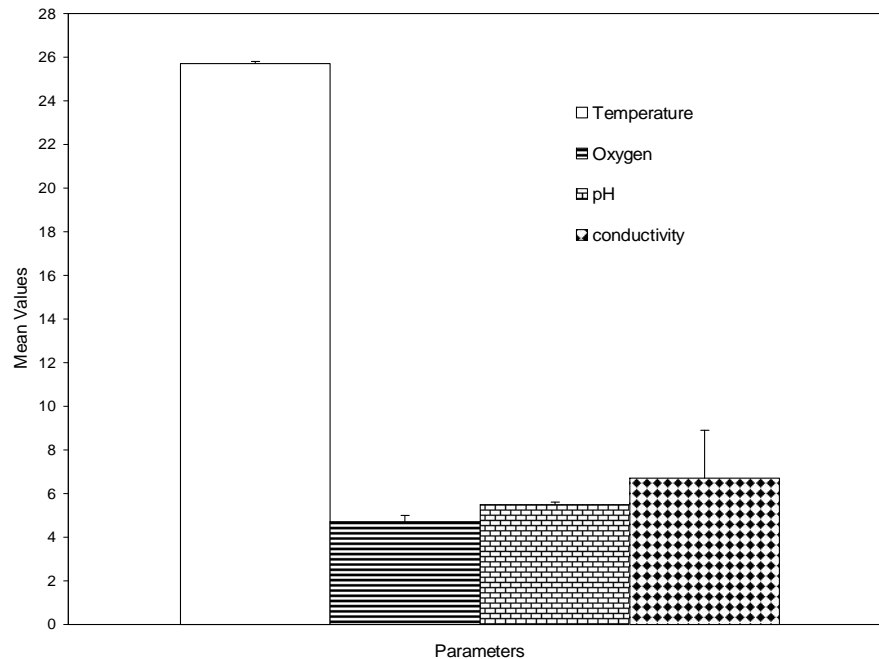
Figure 4. Mean values ± standard deviation of temperature (°C), pH, electric conductivity (µS/cm) and dissolved oxygen concentration (mg/L) of water in tanks of ornamental fish exporter in Manaus, Amazonas State.

Table 2. Parasitological indexes in five ornamental freshwater fishes from an exporter's holding facility in Amazonas state, Brazil.

Parasites	PF/EF	Prevalence (%)	TNP	Mean Intensity	Mean relative dominance
Monogenoidea	70/218	32.1	338	4.8	0.668
Nematoda adult	46/218	21.1	99	2.1	0.196
Nematoda larvae	18/218	8.2	131	7.3	0.259
I. multifiliis	12/218	5.5	50	4.2	0.098
Trichodina sp.	6/218	2.7	57	9.5	0.113
P. pilullare	5/218	2.3	18	3.6	0.035
Henneguya sp.	1/218	0.4	20	20.0	0.039
Digenea adult	10/218	4.6	16	1.6	0.027
Digenea metacercariae	3/218	1.4	77	25.7	0.152
Placobdella sp.	1/218	0.4	1	1.0	0.002
Total	132/218	60.5	807	-	-

PF/EF: Parasitized fish/examined fish; TNP: total number of parasites.

Table 3. Parasitological indexes of *Ichthyophthirius multifiliis* in the gills of five ornamental freshwater fishes from an exporter's holding facility in the Amazonas State, Brazil.

Parameters/Hosts	*P. axelrodi*	*H. copelandi*	*D. urostriatum*	*Otocinclus* sp.	*Apistogramma* sp.
Examined fish	89	34	30	32	33
Parasitized fish	7	3	2	0	0
Prevalence (%)	7.9	8.8	6.7	0	0
Total number of parasites	6	8	8	0	0
Mean intensity (MI)	4.9	2.7	4.0	0	0
Range of MI	1–9	2-3	4	0	0

Table 4. Parasitological indexes of *Piscinoodinium pilullare* in the gills of five ornamental freshwater fishes from an exporter's holding facility in the Amazonas State, Brazil.

Parameters/Hosts	*P. axelrodi*	*H. copelandi*	*D. urostriatum*	*Otocinclus* sp.	*Apistogramma* sp.
Examined fish	89	34	30	32	33
Parasitized fish	3	2	0	0	0
Prevalence (%)	3.4	5.9	0	0	0
Total number of parasites	6	12	0	0	0
Mean intensity	2.0	6.0	0	0	0
Range of MI	1–3	5-7	0	0	0

Table 5. Parasitological indexes of *Trichodina* sp. in the gills of five ornamental freshwater fishes from an exporter's holding facility in the Amazonas State, Brazil.

Parameters/Hosts	*P. axelrodi*	*H. copelandi*	*D. urostriatum*	*Otocinclus* sp.	*Apistogramma* sp.
Examined fish	89	0	30	32	33
Parasitized fish	3	0	0	6	0
Prevalence (%)	3.4	0	0	18.7	0
Total number of parasites	6	0	0	57	0
Mean intensity	2.0	0	0	9.5	0
Range of MI	1–3	0	0	2-30	0

Table 6. Parasitological indexes of Monogenoidea in the gills of five ornamental freshwater fishes from an exporter's holding facility in the Amazonas State, Brazil.

Parameters/Hosts	*P. axelrodi*	*H. copelandi*	*D. urostriatum*	*Otocinclus* sp.	*Apistogramma* sp.
Examined fish	89	34	30	32	33
Parasitized fish	38	8	12	11	1
Prevalence (%)	42.7	23.5	40.0	34.4	3.0
Total number of parasites	100	11	99	127	1
Mean intensity	2.6	1.4	8.2	11.5	1.0
Range of MI	1–6	1-2	1-21	5-17	1

Table 7. Parasitological indexes of Nematoda in the intestines of five ornamental freshwater fishes from an exporter's holding facility in the Amazonas State, Brazil.

Parameters/Hosts	*P. axelrodi*	*H. copelandi*	*D. urostriatum*	*Otocinclus* sp.	*Apistogramma* sp.
Examined fish	89	34	30	32	33
Parasitized fish	21	6	1	5	13
Prevalence (%)	23.6	17.6	3.3	15.6	39.4
Total number of parasites	50	7	1	10	31
Mean intensity	2.4	1.2	1.0	2.0	2.4
Range of parasites	1–14	1-2	1	1-6	1-3

Table 8. Parasitological indexes of Digenea in the intestines of five ornamental freshwater fishes from an exporter's holding facility in the Amazonas State, Brazil.

Parameters/Hosts	*P. axelrodi*	*H. copelandi*	*D. urostriatum*	*Otocinclus* sp.	*Apistogramma* sp.
Examined fish	89	34	30	32	33
Parasitized fish	1	4	0	5	0
Prevalence (%)	1.1	11.8	0	15.6	0
Total number of parasites	1	8	0	7	0
Mean intensity	1.0	2.0	0	1.4	0
Range of MI	1	1-4	0	1-3	0

Parasites of freshwater ornamental fishes from Southern Brazil

A survey of parasitic fauna on freshwater ornamental fishes from commercial supplier at the Florianópolis city, Santa Catarina State, Southern Brazil was performed by Piazza et al. (2006). A total of 18 fish species were examined for a period o one year. From a total of 189 fish examined, 75 (40.5%) were parasitized (Table 9). The highest prevalence rate (100%) was found in *Gymnocorymbus ternetzi*, *Paracheirodon innesi*, *Colisa lalia*, *Noemacheitus barbatulus*, *Pteprophyllum scalare*, *Helostoma temmincki* and *Mikrogeophagus ramirezi*. Intermediate values of prevalence were registered in *Xiphophorus helleri* (71%), *Poecilia sphenops* (40%), *Beta splendens* (50%), *Carassius auratus* (67%) and *Cyprinus carpio* (50%). *Trichogaster trichopterus*, *Poecilia reticulata*, *Macropodus opercularis* and *Pseudotropheus socolofi* were not parasitized. Parasites showed the following prevalences: Monogenoidea (15.7%), metacercariae of heterophyid digenean *Ascocotyle* sp. Looss, 1899 (15.3%), dinoflagellate *Piscinoodinium pillulare* (Schäperclaus, 1954) Lom, 1981 (7.0%), ciliate protozoans *Trichodina acuta* Lom, 1961 (4.9%) and *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 (3.8%), cestodes (2.7%), camallanid nematode *Camallanus maculatus* Martins, Garcia, Piazza and Ghiraldelli, 2007 (2.7%); copepod crustacean *Lernaea cyprinacea* Linnaeus, 1758 (2.2%) and *Chilodonella* sp. Strand, 1928 (0.5%).

The majority of fish examined was parasitized by one parasite species, followed by two and three parasites. From four parasites per host species the occurrence was lower (Figure 5). The most dominant taxon of parasite was Digenea in metacercarial stage named *Ascocotyle* sp. followed by Monogenoidea (Table 10)

Digenean are endoparasites with complex life cycle generally found encysted in the muscle, nervous system, gonads, other internal organs or free in eyes (Pavanelli et al., 2002; Santos et al., 2002). Its main pathogenic action is when the fish act as intermediate host in which encysts causing tissue damage (Takemoto et al., 2004). Thus the metacercarial form is more aggressive than the adult worms. Metacercariae of *Neascus* sp. and *Clinostomum* sp., cause respectively black spot and yellow grub diseases and are important parasites to the ornamental fish industry by its location on the body surface or fins. According to Carvalho et al. (2008) 90% of *Geophagus brasiliensis* examined from the Peixe River, Juiz de Fora, MG, were parasitized with *Neascus* sp. At a mean intensity varying from 1 to 75 parasites. Kuo et al. (1994) registered prevalences of 0.9% *Clinostomum* sp. and 4% *Centrocestus* sp. in a survey realized in imported fish from China. Metacercariae of *Ascocotyle tenuicollis*, *A. nunezae* and *A. nana* were described from the heart, gills and viscera of *Poecilia petenensis*, *Cichlasoma meeki* and *C. octofasciatum* (Scholz et al., 1997). On the other hand, *Centrocestus* sp. was found encysted in the gill filaments of *Carassius auratus*, *Poecilia reticulata*, *Beta splendens*, *Xiphophorus variatus* and *Poecilia latipinna* (Tampieri et al., 1999) at 100% prevalence. It is important to emphasize that birds act as definitive hosts and snails as the first intermediate host (Scholz et al., 1997). In ornamental farms from Sri Lanka, Thilakaratne et al. (2003) observed low (0.8%) prevalence of *Centrocestus* sp. in *C. auratus*. In Brazil, Piazza et al. (2006), have reported infection rates of *Ascocotyle* sp. reaching 7,844 specimens in 29 infected fish with mean intensity varying from 1 to 1,070 parasites per host (Tables 10-11).

In comparison, the data here reported as prevalence and mean intensity are higher than that related in the literature. This is, in fact due to commercial supplier located in Southern Brazil that presents the appropriate condition for intermediate and definitive hosts to close the life cycle successfully.

On the other hand, Monogenoidea was found in 11 out of 18 analyzed fish species at a mean intensity varying from 2 to 60 parasites. They are among one the most important fish parasites causing economic losses in fish culture for consumption or ornamentals (Thoney & Hargis Junior, 1991). Their life cycle is direct or monoxenic without the involvement of intermediate host, and its pathogenicity is related to mechanical damage produced by attachment on the body surface or gills (Noga, 1995). Moreover, the water quality may present correlation with parasite number in which is characterized by a decrease in Monogenoidea number in elevated pH and electric conductivity conditions (Garcia et al., 2003). This is reinforced by the prophylactic method of salt addition (60 $g.m^{-3}$) in fish ponds as efficient practice to avoid parasitosis (Martins, 2004). Water temperature can constitute an important factor to control Monogenoidea reproduction. In *Gyrodactylus bullatarudis*, common parasite of *P. reticulata* the highest average fecundity was obtained at 25.5 °C while the highest birth rate of Monogenoidea was related at 27,5°C (Scott & Nokes, 1984). In the Brazilian ornamental fish this effect has not yet been studied. From these data we can handle the water temperature to an increase or a decrease in the fecundity of Monogenoidea without affect the host health. In the studies of Piazza et al. (2006), the commercial suppliers where the fish was collected the water temperature was maintained at 28°C favoring parasite's reproduction. The maximum Monogenoidea population increasing in guppies was reported at 27.5°C (Scott & Nokes, 1984).

Prevalence of 15.3% Monogenoidea in *X. helleri* (Table 9) was higher than that related in *P. reticulata* (Dove & Ernst, 1998). Similar results were found by Garcia et al. (2003) in *X. maculatus* in the Northeast of the São Paulo State. These authors have registered 20 to 100% prevalence of *Urocleidoides* sp. (Monogenoidea) in fish at a mean intensity of infection varying from 1.7 to 16.8. This is the contrary to that observed by Piazza et al. (2006) with mean intensities from 27 to 60 parasites per host.

In the majority of examined fish the number of Monogenoidea was considered high in relation to body size. According to Thoney & Hargis (1991) 30 to 40 dactylogyrids may cause die in fish 3 to 4 cm length. After that, it can be concluded that the number of Monogenoidea between 27 and 60 parasites per host observed in the studies of Piazza et al. (2006) suggests fish health compromising and consequently economic losses.

Trichodinids are ciliated protozoan that might be opportunist ectoparasite with low host specificity, found on the body surface, fins and gills (Ghiraldelli et al., 2006). Its reproduction by binary fission allows the rapid reproduction (Mancini et al., 2000) and is directly related to high contents of organic matter in water (Moraes & Martins, 2004). They are among one of main etiological agents causing disease in cultured fish (Vargas et al., 2000; Martins et al., 2002). It must be commented on their host specificity. The capacity of trichodinids occurs or not in an especial host might be discussed and contested. For example, *T. heterodentata* is found in cichlid, cyprinid, gobiid and poecilid fishes as registered by Duncan (1977), Al-Rasheid (2000), Basson & Van As (1992, 1994) and Dove & O´Donoghue (2005). On the other

hand, *T. sylhetensis*, *T. aplocheilusi*, *T. chittagongensis* was found respectively in *Nandus nandus*, *Aplocheilus panchax* and *Labeo bata* by Asmat et al. (2003) e Asmat (2005). On this way, the low host specificity of trichodinids can be contested according to published data. We can assume that exist variability in trichodinid host-specificity according to the environment quality in a fish farm and fish species.

Little information on trichodinid infestation in the Brazilian ornamental fish is found (Garcia et al., 2009). These authors related 54% *Trichodina* sp. in *Xiphophorus* spp. from ornamental fish farm in the State of São Paulo. Nevertheless, they argued that reduction in dissolved oxygen concentration and the addition of organic fertilizer favored the parasite reproduction. In fish commercialized in Florianópolis, SC, *Trichodina acuta* was found in *X. maculatus*, *X. helleri*, *P. sphenops*, *B. splendens*, *C. auratus* and *N. barbatulus* at a mean intensity of 1 to 31 parasites varying from 1 to 35 parasites per host (Piazza et al., 2006). According to Madsen et al. (2000) trichodinid infestation was divided in three categories: category 1 comprehending 1 to 10 parasites per host, category 3 comprehending 100 to 1,000 trichodinids per host. On the other hand, in the majority of analyzed fish the infestation was in category 2 (11 to 100 parasites per host). Trichodinid parasitism is directly related to water quality, high stocking density, temperature and organic pollution (Moraes & Martins, 2004; Ogut & Palm, 2005). These studies suggested high stocking density in aquaria as the most important source of infestation (Piazza et al., 2006). Consequently, its presence in a fish farm at a category 2 must be constantly monitored.

Dinoflagellate *P. pillulare* was found in five fish species (Table 8). Obligatory parasites that attach host cells provided by rizocysts (prolongation like roots), may cause petechial hemorrhages, integument hemorrhages, gill hyperplasia, lamellar fusion, and necrosis that frequently comes to severe mortality (Martins et al., 2001). First report in Brazil was in the State of São Paulo (Martins et al., 2001) in which caused mortality of 3,000 fish in 15 days of infection. The appearance of disease in ornamental fish is more evident than in cultured fish for consumption. Fish can show white spots on the body surface and fins compromising the commercialization.

The *I. multifiliis* (called as Ich), ciliate protozoan cause significant losses in ornamental fish culture (Thilakaratne et al., 2003). Ectoparasite of low host-especificity parasitizes the body surface or gills reaching 1 mm diameter. After definitive host a fish, comes down to substrate or aquarium botton in which develops in tomont and posteriorly in infective theront (Buchmann et al., 2001). In cultivated fish for human consumption they are found in a great number and/or prevalence because their reproduction is favored by climatic or water changes especially in temperate region (Garcia et al., 2009).

In studies with the hybrid *X. maculatus* x *X. variatus*, Clayton & Price (1988) did not observe nor influence of the host genus neither water temperature on the Ich parasitism. But, they argued that a genetic factor can be responsible for resistance.

Piazza et al. (2006) have reported *I. multifiliis* infestation in *X. maculatus*, *X. helleri* and *P. shenops* at a prevalence of 3.8%, different to that registered in *X. maculatus* and *X. helleri* (13%) in the State of São Paulo by Garcia et al. (2009). These authors commented that high electric conductivity of water reduced *I. multifiliis* infestation and the sodium chloride (salt) additioned to

ponds water consists in efficient method for parasite control. Nevertheless, pH handling might be an efficient strategy for parasite control. Garcia et al. (2009) observed negative correlation between Ich and elevated pH of water in ornamental fish farm.

The nematode *Camallanus cotti* Fujita, 1927 was firstly related in freshwater fish from Japan (Fujita, 1927). Common parasite found in the intestines feeds of blood, tissue liquids or cells host. Heavy infection with a great number of nematode causes inflammatory reaction, anemia, sexual behavior changes and mortality, especially in shorter fish (Wu et al., 2007). This nematode is worldwide distributed allied to introduction of poecilid fish as ornamental fish or to control fly (Kim et al., 2002). In Brazil, *Camallanus acaudatus* and *Camallanus tridentatus* were described in *Osteoglossum bicirrhosum* and *Arapaima gigas* by Ferraz & Thatcher (1990). On the other hand, Martins et al. (2007) described *C. maculatus* in *X. maculatus* from a fish farm in the São Paulo State with a prevalence of 82.0%. In Florianópolis, Southern Brazil, Piazza et al. (2006), the nematode showed low prevalence (2.7%) in *X. maculatus* and *P. sphenops*. In experimental infection with camallanid larvae (*C. maculatus*) in copepod crustacean (*Notodiaptomus* sp.), Martins et al. (2007) found that 24 h after infection the larvae were located successfully in the hemocele of crustacean. This study showed the importance and feasibility of the uses of crustacean as a disease vector.

Xiphophorus maculatus was the unique fish parasitized by all parasites taxa (Tables 10-11) reaching 41% from the total examined fish. It is suggested that high number of *X. maculatus* analyzed provoked the difference in relation to other fish species. *Xiphophorus* species are, in fact, the most common and commercialized fish among the aquarists. Seven fish species were parasitized by one parasite taxon, followed by two and three parasite taxa. Multiple occurrences of parasite taxa (five or six parasites) were registered only in one host species. Prevalence rate of *I. multifiliis*, *T. acuta,* Monogenoidea and nematodes here observed was lower than those observed by Conroy et al. (1981). On the other hand, *Trichodina* sp., *P. pillulare*, *I. multifiliis*, Monogenoidea and digenean showed higher prevalence in comparison to findings of Kuo et al. (1994). The protozoans *I. multifiliis* and *P. pillulare* can proliferate if the water conditions are adequate. In this study, mean intensity of parasites it depended on the fish health status. Although *I. multifilis* is the most common parasite in ornamental fish culture but no case of severe infection was observed. Low prevalence (3.7%) of *I. multifiliis* was noted, being *X. maculatus*, *X, helleri*, *P. sphenops* affected fish. Contrarily to mean intensity of 98 parasites observed in *P. sphenops*, greater mean intensity (442.100 parasites) was reported in *Leporinus macrocephalus* (Tavares-Dias et al., 2001). Important factors can favor its reproduction as low water temperature, high stocking density and nutritional deficiency.

Lernaea cyprinacea is actually dispersed worldwide and in severe cases if infestation causes fish mortality and refuse of consumers (Martins et al., 2002). Gabrielli & Orsi (2000) registered the presence of *L. cyprinacea* in fish farms and Tibagi river, Paraná State. According their results, not only cultivated fish but also native fish from river are infested. This copepod has low host-specificity. In the studies of Piazza et al. (2006) lerneosis was related in 2.1% prevalence in *X. maculatus* and *P. sphenops* one parasite per host (Table 10). In molly (*Poecilia latipinna*) from India, Kumaraguru et al. (2006)

related for the first time in that country *L. cyprinacea*. Contrarily to that found in this study by Piazza et al. (2006), Kumaraguru et al. (2006) reported high infestation with 38 parasites in one female fish of 78 mm length. Fish susceptibility it depends on fish species and environment. In a survey of *L. cyprinacea* from aquarium fish, Shariff et al. (1986), observed higher susceptibility of *Helostoma temmincki*, an introduced fish, in which was infested for the first time. Santos & Brasil-Sato (2006) analyzing *Franciscodoras marmoratus* from the Upper São Francisco river observed copepodids of *L. cyprinacea* when fish were stocked before necropsy. They affirmed that parasitosis was dependent on the body size. On this view, greater fish was more parasitized than smallest. The importance of introduction and dissemination of lerneosis in varied aquatic systems especially in aquarium must be thought.

In summary, the most dominant parasite taxon in the studies of Piazza et al. (2006) was Digenea (larval stage) followed by Monogenoidea. The mean intensity of metacercariae and Monogenoidea was sufficient to cause prejudice to fish health. *Xiphophorus maculatus* was the unique fish species parasitized by 9 types of parasites. It can be concluded that inadequate prophylactic methods in fish farm favored the reproduction and dissemination of parasites in ornamental fish. In this study, the highest parasite prevalence was found by Monogenoidea in fish from the Amazonian region followed by nematodes. *Ichthyophthirius multifillis* and *Piscinoodinium pillulare* showed low prevalence rates in the analyzed fish. Sanitary handling must be considered to avoid diseased or asymptomatic fish introduction. This is, in fact, proved when analyzing *X. maculatus* and *X. helleri* as the most parasitized fish. For freshwater fish, Thoney & Hargis Junior (1991) suggested salt bath at 35 $g.L^{-1}$ for 10 minutes. It must be considered the fish tolerance to salt that vary depending on fish species and age. Ornamental and cultured fish maintained in ponds or tanks the addition of 60 $mg.L^{-1}$ sodium chloride for 8 to 12 hours with water circulation is recommended. This practice reduces the stress and avoids the parasite dissemination (Martins, 2004). Kumaraguru et al. (2006) found successfully control *Lernaea cyprinacea* infestation with 10 $g.L^{-1}$ in poecilid fish. Other practices must be commented as the constant water quality and fish health monitoring to verify changes responsible for parasite reproduction. Moreover, earth ponds for ornamental culture must be disinfected with lime to avoid reinfection as well as quarantine practice, certified fish by qualified professionals before and after transport. If these practices allied to technician, farmers and researchers integration the productivity and expansion of ornamental fish industry it reachs the best performance.

Table 9. Prevalence and mean relative dominance of parasites in freshwater ornamental fishes from Southern Brazil (Piazza et al., 2006).

Parasites	Parasitized fish /examined fish	Prevalence (%)	Mean relative dominance
Monogenoidea	29/189	15.3	0.052
Ascocotyle sp	29/189	15.3	0.907
Piscinoodinium pillulare	13/189	6.9	0.012
Trichodina acuta	9/189	4.7	0.012
Ichthyophthirius multifiliis	7/189	3.7	0.012
Cestoidea	5/189	2.6	0.002
Camallanus maculatus	5/189	2.6	0.001
Lernaea cyprinacea	4/189	2.1	0.000
Chilodonella sp	1/189	0.5	0.000
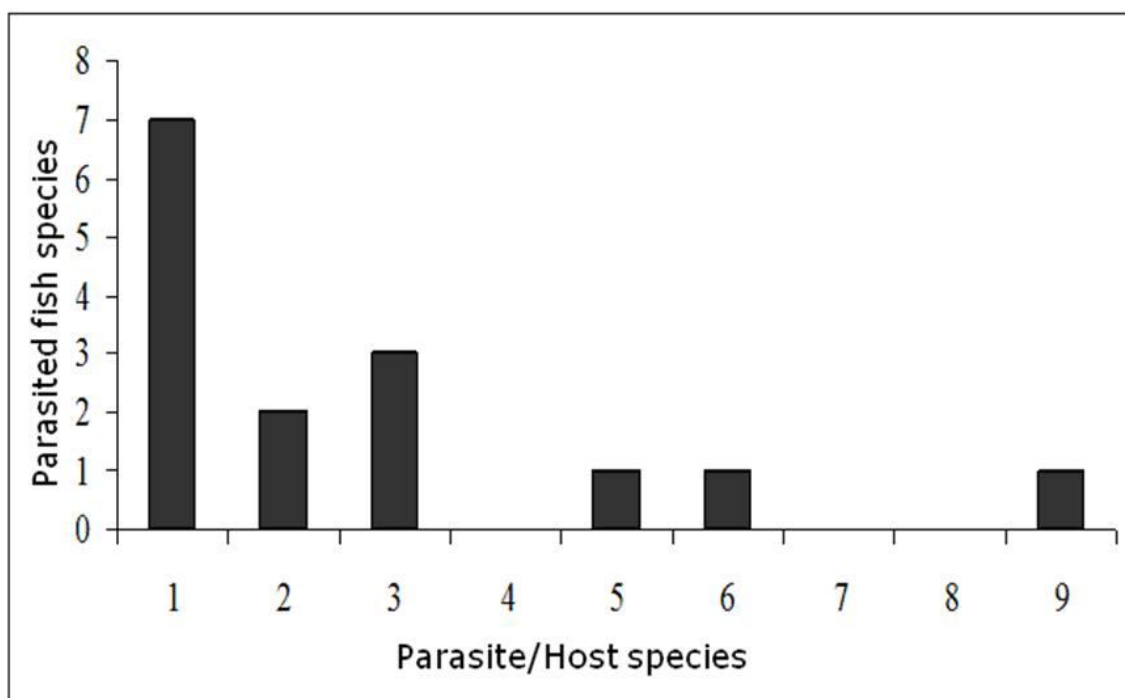
Figure 5. Relationship between freshwater ornamental fish species parasitized from Florianópolis, SC, Brazil, and number of parasite species.

Table 10. Distribution frequency of parasites in freshwater ornamental fishes from Florianópolis, Santa Catarina, Southern Brazil (Piazza et al., 2006).

Fish host	*T. acuta*	*I. multifiliis*	*Chilodonella*	*P. pillulare*	Monogenoidea	*Ascocotyle*	Cestoidea	*C. maculatus*	*L. cyprinacea*
X. maculatus	3	5	1	3	3	19	2	2	3
X. helleri	1	1	0	0	8	7	1	0	
P. sphenops	1	1	0	3	4	0	0	3	1
T. tricopterus	0	0	0	0	0	0	0	0	
B. splendens	2	0	0	0	2	1	0	0	
P. conchonius	0	0	0	0	0	0	1	0	
C. auratus	1	0	0	1	3	0	0	0	
G. ternetzi	0	0	0	0	4	1	0	0	
P. reticulata	0	0	0	0	0	0	0	0	
P. innesi	0	0	0	2	0	0	0	0	
M. opercularis	0	0	0	0	0	0	0	0	
C. carpio	0	0	0	0	1	0	1	0	
C. lalia	0	0	0	1	1	1	0	0	
N. barbatulus	1	0	0	0	0	0	0	0	
P. scalare	0	0	0	0	1	0	0	0	
P. socolofi	0	0	0	0	0	0	0	0	
H. temmincki	0	0	0	0	1	0	0	0	
M. ramirezi	0	0	0	0	1	0	0	0	
Total	9	7	1	10	29	29	5	5	4

Table 11. Mean intensity and range between parentheses in ornamental freshwater fish from Florianópolis, SC, Brazil, June 2004 through July 2005 (Piazza et al., 2006).

Fish host	*T. acuta*	*I. multifiliis*	*Chilodonella*	*P. pillulare*	Monogenoidea	*Ascocotyle*	Cestoidea	*C. maculatus*	*L. cyprinacea*
X. maculatus	10.3±12.7 (2-25)	2.0±1.73 (1-5)	3.0	7.0±9.5 (1-18)	2.0±1.0 (1-3)	335.0±365.3 (1-1070)	4.5±3.5 (2-7)	4.5±0.7 (3-4)	1.0
X. helleri	5.0	20,0	-	-	5.7±3.2 (1-10)	205.4±181.8 (80-313)	3.0	-	
P. sphenops	1.0	98,0	-	13.0±14.2 (2-29)	4,7±3,0 (1-8)	-	-	2.0±1.0 (1-3)	1.0
M. opercularis	-	-	-	-	-	-	-	-	
T. trichopterus	-	-	-	-	-	-	-	-	
B. splendens	31.0±5.7 (27-35)	-	-	-	31.5±16.3 (20-43)	2.0	-	-	
P. conchonius	-	-	-	-	-	-	4.0	-	
C. auratus	7.0	-	-	3.0	31.7±26.7 (1-50)	-	-	-	
G. ternetzi	-	-	-	-	27.7±28.1 (5-68)	1	-	-	

Parasites of cultured ornamental fish from the Brazilian Southeast region

Nowadays, most of Brazilian producers of ornamental fish have the aquaculture as the principal activity, in contrast of last decades (Fujimoto et al., 2006). Hence, ornamental fish export has emerged as an important activity generating foreign exchange for the three states of Southeast region (Figure 6), Rio of Janeiro (RJ), São Paulo (SP) and Espírito Santo (ES). From 2006 to 2007, these states exported US$ 418.572 in freshwater ornamental fish. In 2007, this production has increased 100%.
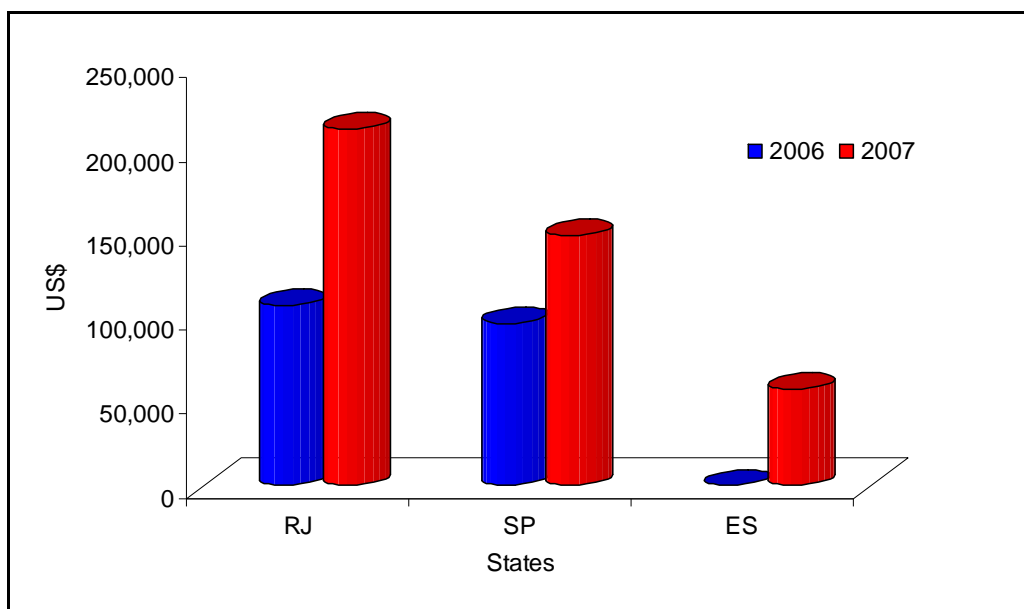
Figure 6.Production of freshwater ornamental fish in Rio of Janeiro (RJ), São Paulo (SP) and Espírito Santo (ES) States, in 2006 and 2007. Ibama (2008).

As the demand for cultured ornamental fish is increasing, consequently the parasitic infections can be one of the most impacting problems for cultured fish in Southeast region. In Brazil, few studies regarding parasitic infections of cultured ornamental fish exist (Piazza et al., 2006; Tavares-Dias et al., 2009). High Prevalence rates of metazoan parasites such as nematodes and Monogenoidea have been reported from cultured ornamental fish in fish farms or pet shop from Rio of Janeiro and São Paulo states (Table 12). However, in fish farms of other Brazilian states the infections rates are still unknown.

Ornamental fish in intensive culture are continuously affected by management practices such as handling, crowding, transport, poor water quality, and frequently provokes stress to fish, rendering them susceptibility to a variety of other parasites and pathogens. Infections by nematodes *Camallanus cotti* have been responsible for high mortality rate of *Poecilia reticulata*, in Rio of Janeiro fish farm (Alves et al., 2000). This mortality was due to the pathology caused by *C. cotti*, which includes microscopic lesions with hemorrhage, congestion, edema, extensive areas of erosion on the mucosa and rectum, with an enlargement of the intestinal walls, without the presence of inflammatory cells (Menezes et al., 2006). Moreover, metacercariae of *Clinostomum marginatum* (yellow-spot disease) have been found causing lesions on the fin of *P. scalare* (Alves et al., 2001).

Table 12. Ornamental fish parasites of intensive culture in Southeast region from Brazil.

Host fish	Parasites	P (%)	MI	Reference
Xiphophorus sp.	*Urocleidoides* sp.	100	6.6	Garcia et al.(2003)
Xiphophorus sp.	*I. mutifiliis*	22.2	1.5	Garcia et al.(2009)
Xiphophorus sp.	*Trrichodina* sp.	54.2	1.4	Garcia et al.(2009)
P. scalare	Monogenea	100	50	Fujimoto et al. (2006)
S. discus	*Dactylogyrus* sp.	-	-	Dambros (2007)
P. reticulata	*C. cotti*	93,4	4.0	Alves et al.(2000)
P. scalare	*Capillaria sp.*	100	~14	Fujimoto et al.(2006)
X. maculatus	*C. maculatus*	82	2.8	Martins et al.(2005)
P. reticulata	*C. cotti*	-	-	Menezes et al.(2006)
B. splendens	*C. cotti*	-	-	Menezes et al.(2006)
P. scalare	*C. marginatum*	-	1-93	Alves et al.(2001)

P= prevalence; MI= mean intensity.

Concluding Remarks

Parasitic infections represent an important challenge for ornamental fish, and that is undesirable in culture, same when in low intensity. High stocking density can also facilitate the rapid propagation of parasites, leading to the occurrence of severe diseases in the culture. Therefore, quarantine and prophylaxis are extremely important in the ornamental aquaculture, as well as in the exportation stage and hence must not be neglected (Tavares-Dias et al., 2009). Furthermore, if the tanks and nets are not properly disinfected, parasitic infections may easily spread to other fish species kept in tanks of the fish farm or handled with the same nets. Hence, any ornamental fish trade operated without appropriate practices causes significant economic losses for the exporter, as well as negative influence to exportation. As a result, the introduction of transmissible parasites may cause serious disease outbreaks.

Acknowledgments

The authors thank ‘‘National Council of Scientific and Technologic Development (CNPq) for Grant to M. Tavares-Dias (300472/2008-0) and M. L. Martins (301072/2007-8).

References

AL-RASHEID, K. A. S. 2000. Trichodinid ectoparasites (Ciliophora: Peritrichida) of some River Nile fish, Egypt. *Parasitol. Int.*, 49:131-137.

ALVES, D. R.; LUQUE, J. L.; PARAGUASSU, A. R. 2001. Metacercárias de *Clinostomum marginatum* (Digenea:Clinostomidae) em acará-bandeira *Pterophyllum scalare* (Osteichthyes: Cichlidae) no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Parasitol. Dia*, 25:70-72.

ALVES, D. R; LUQUE, J. L.; PARAGUASSU, A. R.; MARQUES, F. A. 2000. Ocorrência de *camallanus cotti* (Nematoda: Camallanidae) parasitando o guppy, *Poecilia reticulata* (Osteichthyes: Poeciliidae) no Brasil. *Rev. Univ. Rural Ciên. Vida*, 22:77-79.

ANDRADE, S. M. S.; MALTA, J. C. O.; FERRAZ, E. 2001. Fauna parasitária de alevinos de matrinchã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) coletados nos rios Negro e Solimões, na Amazônia Central. *Acta Amazonica,* 31: 263-273.

ASMAT, G. S. M. 2005. Trichodinid ectoparasites (Ciliophora: Trichodinidae) of fishes in India. *Res. J. Agric. Biol. Sci.,* 1:31-37.

ASMAT, G. S. M.; KIBRIA, Md. M.; NAHER, L. 2003. Trichodina gulshae sp. n. (Ciliophora: Trichodinidae) from the gangetic Mystus, *Mystus cavasius* (Hamilton-Buchanan, 1822) (Bagridae) in Chittagong. *Pakistan J. Biol. Sci.*, 6:1608-1611.

BASSON, L.; VAN AS, J. G. 1992. Trichodinid ectoparasites (Ciliophora: Peritrichida) of freshwater fishes of the Zambesi River System, with a reappraisal of host specificity. *Systematic Parasitol.*, 22:81-109.

BASSON , L.; VAN AS, J. G. 1994. Trichodinid ectoparasites (Ciliophora: Peritrichida) of wild and cultured freshwater fishes in Taiwan, with notes on thei origin. *Systematic Parasitol.* 28:197-222.

BUCHMANN, K.; SIGH, J.; NIELSEN, C. V.; DALGAARD, M. 2001. Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliBusis*. *Vet. Parasitol.*, 100:105-116.

BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ, J. M.; SHOSTAK, W. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al*. revisited. *J. Parasitol.,* 83:575-583.

CARVALHO, A. R.; TAVARES, L. E. R.; LUQUE, J. L. 2008. Metacercárias tipo *Neascus* em *Geophagus brasiliensis* (Perciformes: Cichlidae) do rio do Peixe, Juiz de Fora, Brasil. *Acta Scientiarum Biol. Sci.*, 30:315-320.

CHAO, N. L.; PRANG, G.; PETRY, P. 2001. Project Piaba – Maintenance and sutainable development of ornamental fisheries in the Rio Negro basin, Amazonas, Brazil. In: CHAO, N. L.; PETRY, P.; PRANG, G.; SONNESCHIEN, L.; TLUSTY, M. (Ed.). *Conservation and Management of Ornamental Fish Resources of the Rio Negro Basin, Amazonia, Brazil (Project Piaba)*. p. 3-14.

CLAYTON, G.M., PRICE, D.J. 1988. *Ichthyophthirius multifiliis*: standardization of the infection-response model in Ameca splendens (Miller & Fitzsimons). *J. Fish Dis., 11*: 371-377.

CONROY, D. A.; MORALES, J.; PERDOMO, C.; RUIZ, R. A.; SANTACANA, J. A. 1981. Preliminary observations on ornamental fish diseases in northern South America. *Riv. It. Piscic.,* 16(3):86-104.

DAMBROS, A. 2007. *Ectoparasitas em Symphysodon discus criados em aquários na cidade de Cascavel/PR*. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Faculdade Assis Gurgacz.

DOVE, A. D. M.; ERNST, I. 1998. Concurrent invaders – four exotic species of Monogenea now established on exotic freshwater fishes in Australia. *Int. J. Parasitol.,* 28:1755-1764.

DOVE, A. D. M.; O´DONOGHUE, J. 2005. Trichodinids (Ciliophora: Trichodinidae) from native and exotic australian freshwater fishes. *Acta Protozool*., 44:51-60.

DUNCAN, B. L. 1977. Urceolariid ciliates, including three new species, from cultured Phillipine fishes. *Trans. Am. Microsc. Soc*., 96:76-81.

FERRAZ E. 1999. Management and diseases of the ornamental fish exported from the Rio Negro basin. In: VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. (Ed.). *Biology of tropical fishes*. Manaus: INPA, p. 99-111.

FERRAZ, E.; SOMMERVILLE, C. 1998. Pathology of *Piscinoodinium* sp. (Protozoa; Dinoflagellida), parasites of the ornamental freshwater catfishes *Corydoras* spp. and *Brochis splendens* (Pisces: Callichthyidae). *Dis. Aquat. Org.*, 33:43-49.

FERRAZ, E.; THATCHER, V. E. 1990. *Camallanus acaudatus* sp. (Nematoda: Camallanidae) e uma descrição de macho de *Camallanus tridentatus* (Drasche, 1884), parasitas de peixes da Amazônia Brasileira. *Amazoniana*, 11:135-145.

FUJIMOTO, R. Y.; VENDRUSCOLO, L.; SCHALCH, S. H. C.; MORAES, F. R. 2006. Avaliação de três diferentes métodos para o controle de monogenéticos e *Capillaria* sp. (Nematoda: Capillariidae) parasitos de acará-bandeira (*Pterophyllum scalare* Liechtenstein, 1823). *B. Inst Pesca,* 32:183-190.

FUJITA, T. 1927. On new species of nematodes from fishes of Lake Biwa. *Jap. J. Zool.*, 1:169–176.

GABRIELLI, M. A.; ORSI, M. L. 2000. Dispersão de *Lernaea cyprinacea* (Linnaeus) (Crustacea, Copepoda) Na região norte do estado do Paraná, Brasil. *Revta Bras. Zool.*, 17:395-399.

GARCIA, F.; FUJIMOTO, R. Y.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. 2003. Parasitismo de *Xiphophorus* spp. por *Urocleidoides* sp. e sua relação com os parâmetros hídricos. *B. Inst. Pesca,* 29:123-131.

GARCIA, F.; FUJIMOTO, R. Y.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. 2009. Protozoan parasites of *Xiphophorus* spp. (Poeciliidae) and their relation with water characteristics. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 61:156-162.

GHIRALDELLI, L.; MARTINS, M. L.; ADAMANTE, W. B.; YAMASHITA, M. M. 2006. First record of *Trichodina compacta* Van As and Basson, 1989 (Protozoa: Ciliophora) from cultured Nile tilapia in the State of Santa Catarina, Brazil. *Int. J. Zool. Res.*, 2:369-375.

IBAMA. 2008. *Diagnóstico geral das práticas de controle ligadas a exploração, captura, comercialização, exportação e uso de peixes para fins ornamentais e de aquariofilia*. Brasília, DF.

KIM, J. H.; HAYWARD, C. J.; JOH, S. J.; HEO, G. J. 2002. Parasitic infections in live freshwater tropical fishes imported to Korea. *Dis. Aquat. Org*., 52:169-173.

KUMARAGURU, K. P.; RAYKUMAR, M.; TRILLES, J. P.; BALASUBRAMARIAN, T. 2006. A note on *Lernaea cyprinacea* (Crustacea, Copepoda, Lernaeidae) parasitizing the cultured sailfin molly *Poecilia latipinna* and their control with salinity treatment. *J. Fish. Aquat. Sci*., 1:284-290.

KUO, T. F.; CHUNG, C. D.; HSU, T. L. 1994. A survey of parasitic diseases from infested aquarium fishes. *Mem. Coll. Agric. Nat. Taiwan Univ.,* 34:227-238.

MADSEN, H. C. K.; BUCHMANN, K.; MELLERGAARD, S. 2000. Association between trichodiniasis in eel (*Anguilla anguilla*) and water quality in recirculation systems. *Aquaculture*, 187:275-281.

MANCINI, M.; LARRIESTRA, A.; SANCHEZ, J. 2000. Estudio ictiopatológico en poblaciones silvestres de la región centro-sur de la provincia de Córdoba - Argentina. *Rev. Med Vet.*, 81:104-108.

MARTINS, M. L. 2004. Cuidados básicos e alternativas no tratamento de enfermidades na aquicultura brasileira. In: PAIVA, M. J. T. R.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. A. (Org.). *Sanidade de Organismos Aquáticos*. p. 357-370.

MARTINS, M. L.; GARCIA, F.; PIAZZA, R. S.; GHIRALDELLI, L. 2007. *Camallanus maculatus* n. sp. (Nematoda: Camallanidae) in na ornamental fish *Xiphophorus maculates* (Osteichthyes: Poecillidae) cultivated in São Paulo State, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*., 59:1224-1230.

MARTINS, M. L.; MORAES, J. R. E.; ANDRADE, P. M.; SCHALCH, S. H. C.; MORAES, F. R. 2001. *Piscinoodinium pillulare* (Schäperclaus 1954) Lom, 1981 (Dinoflagellida) infection in cultivated freshwater fish from Northeast region of São Paulo State, Brazil. Parasitological and pathological aspects. *Braz. J. Bio.*, 61:639-644.

MARTINS, M. L.; ONAKA, E. M.; MORAES, F. R.; BOZZO, F. R.; PAIVA, A. M. F. C.; GONÇALVES, A. 2002. Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the state of São Paulo, Brazil. *Acta Scientiarum Anim. Sci.,* 24:981-985.

MATOS, E.; SÃO CLEMENTE, S. C.; AZEVEDO, C.; CARVALHO, E. C. Q.; LIMA, F. C. 1998. Infecção por *Ichthyophthirius multifilis* (Protoza) em acari, *Ancistrus* sp. (Pisces: Teleostei), capturados em Belém, Estado do Pará. *Rev. Bras. Ciên. Vet.*, 5:9-10.

MENEZES, R. C.; TORTELLY, R.; TORTELLY-NETO, R.; NORONHA, D.; PINTO, R. M. 2006. *Camallanus cotti* Fujita, 1927 (Nematoda, Camallanoidea) in ornamental aquarium fishes: pathology and morphology. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 101:683-687.

MOLNÁR, K. 1994. Effect of decreased water oxygen content on common carp fry with *Dactylogyrus vastator* (Monogenea) infection of varying severity. *Dis. Aquat. Org.,* 20:153-157.

MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. 2004. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: CYRINO, J. E. P.;

URBINATI, E. C.; FRACALOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. p. 343-383.

MOUTON, A.; BASSON, L.; IMPSON, D. 2001. Health status of ornamental freshwater fishes imported to South Africa: a pilot study. *Aquarium Sci. Conserv.*, 3:327-333.

NOGA, E. J. 1995. *Fish disease – diagnosis and treatment.* St. Louis, Missouri: Mosby.

OGUT, H.; PALM, H. W. 2005. Seasonal dynamics of *Trichodina* spp. On whting (Merlangius merlangus) in relation to organic pollution on the eastern Black Coast of Turkey. *Parasitol. Res.*, 96:149-153.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, C. J.; TAKEMOTO, R. M. 2002. *Doenças de Peixes*: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Maringá: EDUEM.

PIAZZA, R. S.; MARTINS, M. L.; GUIRALDELLI, L.; YAMASHITA, M. M. 2006. Parasitic disease of freshwater ornamental fishes commercialized in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. São Paulo. *B. Inst. Pesca*, 32: 51-57.

PRANG, G. 2007. Na industry analysis of the freshwater ornamental fishery with particular reference to the supply of Brazilian freshwater ornamentals to the UK market. *Uakari*, 3:7-51.

RIBEIRO, F. A. S. 2008. Panorama mundial do mercado de peixes ornamentais. *Panorama da Aqüicultura*, 18(108):32-37.

ROBERTS, R. J. *Patología de Los Peces.* Madrid: Mundi-Prensa, 1981.

ROHDE, K.; HAYWARD, C.; HEAP, M. 1995. Aspects of the ecology of metazoan ectoparasites of marine fishes. *Int. J. Parasitol*, 25:945-970.

SANTOS R. S.; PIMENTA F. D. A., MARTINS M. L.; TAKAHASHI H. K.; MARENGONI N. G. 2002. Metacercárias de *Diplostomum* (A*ustrodiplostomum*) *compactum* Lutz, 1928 (Digenea, Diplostomidae) em peixes do rio Paraná, Brasil. Prevalência, sazonalidade e intensidade de infecção. *Acta Scientiarum*, 24: 475-480.

SANTOS, M. D.; BRASIL-SATO, M. C. 2006. Parasitic community of *Franciscodoras marmoratus* (Reinhardt, 1874) (Pisces, Doradidae) from the upper São Francisco river, Brazil. *Braz. J. Biol*., 60:931-938.

SÃO CLEMENTE, S. C.; PERALTA, A. S. L.; CARVALHO, J. R. J.; MESQUITA, E. F. M.; MATOS, E. 2000. *Ichthyophthirius multifiliis* (Protozoa) in *Gasteropelecus sternicola* (Linneus, 1958) colleted in the área of Belém, State of Pará, Brazil. *Parasitol. Al Dia*, 24:52-54.

SCHOLZ, T.; VARGAS-VÁSQUEZ, J.; AGUIRRE-MACEDO, L.; VIDAL-MARTÍNEZ, V. M. 1997. Species of Ascocotyle Loos, 1899 (Digenea: Heterophyidae) of the Yucatan Peninsula, México, and notes on their life-cycles. *Syst. Parasitol*, 36:161-181.

SCOTT, M.; NOKES, D. J. 1984. Temperature-dependent reproduction and survival of *Gyrodactylus bullatarudis* (Monogenea) on guppies (*Poecilia reticulata*). *Parasitology*, 89:221-227.

SHARIFF, M.; KABATA, Z.; SOMMERVILLE, C. 1986. Host susceptibility to *Lernaea cyprinacea* L. and its treatment in a large aquarium system. *J. Fish Dis.*, 9:393-401.

STERUD, E.; JORGENSEN, A. 2006. Pumpkinseed *Lepomis gibbosus* (Linnaeus, 1758) (Centrarchidae) and associated parasites introduced to Normay. *Aquatic Invasions*, 4:278-280.

TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. de los. A. P.; GUIDELLI, G. M.; PAVANELLI, G. C. 2004. Parasitos de Peixes de Águas Continentais. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. A. P. (Ed.). *Sanidade de Organismos Aquáticos*. p. 179-198.

TAMPIERI, M. P.; CAFFARA, M.; DIEGOLI, G.; GALUPPI, R.; MARCER, F.; MATTIOLI, R.; MINELLI, C.; RESTANI, R. 1999. Prima segnalazione in Italia di *Centrocestus armatus* e *C. Formosanus* (Digenea, Heterophyidae) in pesci d´ácqua dolce di importazione. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 27:27-34.

TAVARES-DIAS, M.; BRITO, M. L. S.; LEMOS, J. R. G. 2009. Protozoários e metazoários parasitos do cardinal *Paracheirodon axelrodi* Schultz, 1956 (Characidae), peixe ornamental proveniente de exportador de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil. *Acta Scientiarum Biol. Sci*., 31:23-28.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. 2001. Fauna parasitária de peixes oriundos de “pesque-pague” do município de Franca, São Paulo, Brasil. I. Protozoários. *Rev. Bras. Zool.*, 18:67-79.

THATCHER, V. E. 2006. *Amazon fish parasites*. 2. ed. Sofia, Moscow: Pensoft Publishers.

THILAKARATNE, I. D. S. I. P.; RAJAPAKSHA, G.; HEWAKOPARA, A.; RAJAPAKSE, R. P. V. J.; FAIZAL, A. C. M. 2003. Parasitic infections in freshwater ornamental fish in Sri Lanka. *Dis. Aqua. Org.,* 54:157-162.

THONEY, D. A.; HARGIS JUNIOR, W. J. 1991. Monogenea (Platyhelmintes) as hazards for fish in confinement. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 1:133-153.

VARGAS, L.; POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P.; MOREIRA, H. L. M. 2000. Ectoparasites prevalence in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) of Thailand origin in Maringá, Paraná. *Arq. Ci. Vet. Zoot. Unipar*, 3:32-37.

WAICHMAN, A. V.; PINHEIRO, M.; MARCON, J. L. 2001. Water quality monitoring during the transport of amazonian ornamental fish. In: CHAO, N. L.; PETRY, P.; PRANG, G.; SONNESCHIEN, L.; TLUSTY, M. (Ed.). *Conservation and Management of Ornamental Fish Resources of the Rio Negro Basin, Amazonia, Brazil (Project Piaba)*. p.279-299.

WU, S. F.; WANG, G. T.; XI, B. W.; GAO, D.; NIE, P. 2007. Population dynamics and maturation cycle of *Camallanus cotti* (Nematoda: Camallanidae) in the Chinese hooksnout carp *Opsariichthys bidens* (Osteichthyes: Cyprinidae) from a reservoir in China. *Vet. Parasitol.,* 147:125-131.

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 20

Patologia viral de peces

Carlos P. Dopazo & Isabel Bandín

Resumen

Las enfermedades virales son una de las principales causas de pérdidas económicas en la acuicultura en todo el mundo. En la actualidad se conoce una gran diversidad de virus que pueden afectar a las especies cultivadas en agua dulce y marina, pero desgraciadamente apenas existen medidas de prevención o de tratamiento contra las enfermedades que pueden causar, y en la mayor parte de los casos no son muy efectivas ni económicamente rentables. Por este motivo, la forma más útil de controlar una enfermedad viral es llevar a cabo un manejo adecuado de los individuos en cultivo y disponer de métodos de diagnóstico rápidos, sensibles y fiables. En esta revisión hemos abordado dos secciones bien diferenciadas: en primer lugar describiremos algunas de las enfermedades virales de mayor importancia y, a continuación, trataremos qué medidas debemos tomar para la prevención y control de las enfermedades virales en acuicultura.

Abstract

Viral diseases are one of the most important causes of economical losses in aquaculture worldwide. At present, there is an important amount of information on a high number of viruses that causes disease in cultured marine and freshwater species. Unfortunately preventive and therapeutic measures are scarcely available, of low efficiency, and/or not economically affordable by farmers. Thus, the most useful way to control a viral disease in aquaculture is to carry out an adequate manipulation of the individuals in the farms and, if symptomatic fish are detected, to use rapid, sensitive and reliable diagnostic methods. In this review we summarize information in two well differentiated sections: In a first section, we describe some of the most important viral diseases worldwide; in a second one, preventive and control measures will be focussed.

Introducción

Las enfermedades virales están consideradas como una de las mayores causas de pérdidas económicas en la Acuicultura en todo el mundo. No quiere decir esto que causen epizootias más frecuentemente que otros patógenos, sino que las infecciones virales son, desgraciadamente, de difícil prevención y control, además de no existir, hasta la fecha, un tratamiento efectivo contra este tipo de enfermedades.

En estas dos últimas décadas se ha logrado una amplia divulgación del conocimiento de la implicación que los virus pueden tener en muchas de las infecciones que afectan a animales acuáticos; sin embargo, su existencia se conoce desde mucho más atrás. De hecho, ya en manuscritos chinos de hace unos 3000 años se describía una enfermedad que podría corresponder con la viremia primaveral de la carpa. De todos modos, la verdadera revolución de la Virología de peces se produciría a mediados del siglo XX. Así, en 1941, M'Gonigle describía una enfermedad que podía corresponder a lo que hoy se conoce como necrosis pancreática infecciosa; a esta enfermedad, que afectaba a alevines de salmones, la denominó enteritis catarral aguda. El descubrimiento de la etiología viral de una enfermedad semejante a la descrita por M'Gonigle sería realizado una década después por Watson et al. (1954). Poco después, y gracias al desarrollo de las técnicas de cultivo celular, se lograría el aislamiento del primer virus de peces, a partir de truchas enfermas (Wolf et al., 1959). A partir de entonces, el desarrollo de la Virología de peces fue paralelo al de las técnicas de cultivo celular y de diagnóstico viral; de este modo, tan sólo cuatro décadas tras el primer aislamiento de un agente viral que afectaba a peces, se han descrito alrededor de 100 virus que afectan a animales acuáticos (Wolf, 1988; Hetrick & Hedrick, 1993), incluyendo tanto virus aislados en cultivo celular como detectados mediante microscopía electrónica, y cada vez se están descubriendo nuevas cepas virales.

De esta gran variedad de virus que afectan a animales acuáticos, sólo una pequeña proporción se puede considerar como productores de enfermedades realmente graves. Todos estos virus se distribuyen entre la mayor parte de las familias de virus animales conocidas hasta el momento. En la Tabla 1 se muestra un esquema de las familias virales que poseen representantes que afectan a peces, moluscos y crustáceos.

En esta revisión incluimos dos capítulos bien diferenciados: En primer lugar describiremos algunas enfermedades virales de importancia y, a continuación, trataremos qué medidas debemos tomar para la prevención y control de las enfermedades virales en acuicultura.

Tabla 1.Virus de animales acuáticos más representativos.

Familia	Virus representativo	Huésped	Mortalidad
Birnaviridae	Virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV)	Salmónidos Rodaballo Seriola Lenguado Lubina Menhaden Anguila outros	Alta en alevines; baja o nula en adultos
Rhabdoviridae	Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV)	Salmónidos	Elevada
	Virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV)	Salmónidos Rodaballo Lenguado Platija Lubina Carpa Anguila	Entre moderada y alta, hasta crónica
Paramyxoviridae	Paramyxovirus de rodaballo Paramyxovirus de lubina Paramyxovirus de salmón	Rodaballo Lubina Salmón	Nula a baja
Orthomyxoviridae	Virus de la Anemia Infecciosa del Salmón (ISAV)	Salmón	Alta a crónica
Togaviridae	Virus de la enfermedad del sueño (SDV) Virus de enfermedad del páncreas (PDV)	Salmónidos	Entre baja y alta
Iridoviridae	Virus de la necrosis eritrocitaria (VEN)	Lubina Salmón Bacalao Seriola	Muy baja o nula
	Virus de los quistes linfoides (linfocistis, LV)	Dorada Lubina Seriola Bacalao	Baja a moderada
Picornaviridae	Picornavirus de rodaballo, mero y lubina	...	Muy baja o nula
Nodaviridae *(g. Betanodavirus)*	Virus de la retinopatía y encefalopatía (VER)	Dorada Lubina Rodaballo Fletán	Alta
Herpesviridae	Herpesvirus salmones (HS) Herpesvirus de pez gato (CCV)	Salmónidos Siluros	Baja o moderada
	Herpesvirus de koi (KHV)	Carpa	Alta
Retroviridae	Sarcomas, fibrosarcomas, leucemias	varios	Moderada-alta

Descripción de algunas enfermedades virales de importancia

Debido a la extensión que implicaría una revisión completa, abordando todos los virus conocidos hasta el momento que de un modo u otro afectan a animales acuáticos, deberemos limitarnos a algunos de los grupos virales que provocan síndromes de mayor gravedad, ya sea por su incidencia y mortalidad, o por las pérdidas económicas que implican.

A - Familia Birnaviridae

La familia *Birnaviridae* incluye un tipo de virus de gran relevancia en la acuicultura tanto marina como continental: el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), que es la especie tipo del género *Aquabirnavirus*.

Características del agente viral

Los aquabirnavirus son virus icosaédricos, monocapsidales, sin envuelta, de un diámedro de 55 a 75 nm (diámetro medio de 62 nm), cuya cápside está constituída por 92 capsómeros (Dobos et al., 1979; Todd & McNulty, 1979). Su genoma es RNA bicatenal bisegmentado, de un tamaño molecular de 2,1 a 2,5 x 10^6 d para el segmento mayor (**A**) y 1,9 a 2,3 x 10^6 d para el **B**, de menor peso molecular (Dobos et al., 1977). El segmento B codifica una proteína estructural de actividad polimerasa (RNA-polimerasa-RNA dependiente). El segmento A codifica una poliproteína que tras su síntesis sufre modificación, dando lugar a las tres restantes proteínas estructurales; además, en este segmento hay otro ORF, de menor tamaño, que codifica una proteína relacionada con el proceso de replicación del genoma.

Los virus IPN son muy estables ante una gran variedad de condiciones naturales y de laboratorio. Así, mantienen su infectividad durante largos períodos de tiempo a 4°C e incluso durante años en condiciones de congelación. El virus es más estable a pH de ligera acidez; también es más estable en aguas de estuario que en agua dulce o marina.

Originariamente, el virus se aisló en cultivos *in vitro* de células de trucha (Wolf et al., 1960); y en la actualidad se conoce un gran número de líneas celulares que se pueden utilizar para la replicación de este tipo de virus, como RTG-2 (gónada de trucha arco iris), CHSE–214 (embrión de salmón chinook), AS (salmón atlántico), o TV-1 (aleta de alevines de rodaballo); recientemente la Unión Europea, con fines de estandarización, ha propuesto la utilización de la línea celular BF-2 para la propagación de este virus.

Uno de los aspectos que entraña mayor complicación en el conocimiento del virus de la necrosis pancreática infecciosa es el de la gran variedad de cepas que se conocen; de hecho, el IPNV es un virus de una gran heterogeneidad antigénica y todos los aislados muestran una cierta interrelación serológica. Tradicionalmente se consideró la existencia de 3 grandes serotipos: uno americano (VR–299) (Wolf et al., 1968) y dos europeos (Sp y Ab) (Jørgensen & Kehlet, 1971). Posteriormente, Hill & Way (1988) propusieron el agrupamiento de todas las cepas de IPNV conocidas en 2 serogrupos (I y II). En base a estos trabajos, Ahne (1985) estableció una nueva clasificación serológica de este virus (Tabla 2); en dicha clasificación,

el serogrupo I estaría constituído por 9 serotipos distintos (cepas tipo: WB, Sp, Ab, He, Te, C1, C2 y C3y Ja), y el serogrupo II por un único serotipo (cepa tipo: TV). Sin embargo, ya se ha publicado el aislamiento de nuevas cepas de IPNV que no muestran neutralización cruzada con estos serotipos, como la cepa N1, aislada de rodaballo y de halibut en Noruega (Christie et al., 1988); asimismo, nuestro equipo ha comprobado que numerosas cepas aisladas en nuestra área no pueden agruparse en ninguno de los serotipos previamente descritos.

La complejidad del tipado llevó a que diversos grupos trabajaran en el desarrollo de otros métodos de tipado. Así, uno de los primeros estudios fue el que llevó a nuestro equipo a comprobar que existe una clara relación entre el tipo serológico del virión y el patrón electroforético de su ácido nucleico, proponiendo éste como un critério útil para el tipado de estos virus (Dopazo, 1991; Cutrín et al., 2000). El uso de secuenciación genómica llevó a Blake et al. (2001) a proponer la existencia de 6 genogrupos, directamente relacionados con la mayoría de los serotipos establecidos. Posteriormente, Zhang & Suzuki (2004), empleando este mismo método de tipado, demostraron la existencia de un genotipo adicional, al que denominaron “Marine Birnavirus” (MABV), que englobaría a los aquabirnavirus de origen marino y filogenéticamente alejados de los virus tipo IPNV. Otra estrategia de tipado fue diseñada por Cutrín et al. (2004) para su aplicación en caso de carecer de secuenciador; conocida como RFLPs, se basa en el análisis de patrones de restricción y ha demostrado ser tan resolutiva como la secuenciación genómica.

Tabla 2. Serogrupos y serotipos de virus tipo-IPNV.

St[1]	Cepa tipo	Huésped original	Lugar
Serogrupo I			
A1	WB (West Buxton)	Trucha arcoíris (*Oncorrhynchus mykiss)*	USA
A2	Sp (Spajarup)	Trucha arcoíris (*Oncorrhynchus mykiss)*	Europa
A3	Ab (Abild)	Trucha arcoíris (*Oncorrhynchus mykiss)*	Europa
A4	He (Hech)	Lucio (*Esox lucius)*	Europa
A5	Te (Tellina)	Tellina (*Tellina tenuis)*	Europa
A6	C1 (Canada 1)	Salmón Atlántico (*Salmo salar)*	Canadá
A7	C2 (Canada 2)	Trucha arcoíris (*Oncorrhynchus mykiss)*	Canadá
A8	C3 (Canada 3)	Trucha lacustre (*Salmo trutta lacustris)*	Canadá
A9	Ja (Jasper)	Trucha arcoíris (*Oncorrhynchus mykiss)*	USA
		Trucha salvelino (*Salvelinus fontinalis)*	USA
Serogrupo II			
B1	TV	Tellina (*Tellina tenuis)*	Europa
		Carpa (*Cyprinus carpio)*	Europa

1- St: Serotipo.

Características de la enfermedad

La necrosis pancreática infecciosa es una enfermedad viral sistémica, aguda y altamente contagiosa, que está extendida por todo el mundo, y que ha sido detectada en un gran número de países y por numerosos equipos de investigación (Tabla 3). Tradicionalmente se consideraba como una infección que afectaba a alevines de peces salmónidos; sin embargo, virus tipo IPNV se han detectado en numerosas especies de peces, y en la actualidad se considera que posiblemente afecte a prácticamente cualquier especie acuática. En los peces afectados, principalmente alevines y fundamentalmente de salmónidos, provoca la muerte en pocas semanas e incluso días, llegando a mortalidades del 80-90%; los supervivientes generalmente se convierten en portadores asintomáticos del virus, actuando como reservorios asintomáticos que, por lo tanto, representan nuevos focos de contaminación, transfiriendo la infección a peces sanos (transmisión horizontal) o a las generaciones descendientes (transmisión vertical).

Los síntomas externos incluyen: natación espiral y errática (con momentos en que se detienen en el fondo del tanque, donde muestran respiración acelerada), oscurecimiento de la piel, distensión abdominal (provocada por una gran acumulación de líquido ascítico), moderada exoftalmia, palidez de las agallas y hemorragias en aletas ventrales; en ocasiones, los peces arrastran hilos fecales anclados al orificio anal, de modo semejante a lo que ocurre con otros virus como el IHNV. El tracto intestinal se encuentra vacío y la cavidad abdominal aparece llena de abundante líquido ascítico, de aspecto blanquecino. Hígado, riñón, corazón y bazo presentan un aspecto pálido y en ocasiones los ciegos pilóricos muestran petequias.

Aunque la denominación de esta enfermedad hace referencia al efecto histopatológico del virus sobre el tejido pancreático, la necrosis afecta con más frecuencia a otros órganos. Así, algunos autores (McKnight & Roberts, 1976) han publicado la presencia de necrosis focales en el tejido hematopoyético renal y en la mucosa intestinal, como histopatología más característica de esta enfermedad; otros autores han observado degeneración de las células parenquimales y necrosis hepática en alevines de salmones infectados (Sano, 1971b; Kudo et al., 1973).

El contagio se produce fundamentalmente por transmisión horizontal, vía orina y heces de los individuos infectados. Sin embargo, también se ha demostrado la transmisión vertical, a través de los productos sexuales de los peces reproductores (Ahne, y Negele, 1985).

Puesto que no existe un tratamiento 100% efectivo para esta enfermedad, se deben aplicar medidas de control como la selección de lotes de peces sanos y la vigilancia de las importaciones de huevos fecundados. Sin embargo, en caso de detección de la enfermedad la única medida efectiva es la destrucción de los peces y desinfección de los tanques. Algunos autores han propuesto procedimientos de prevención mediante desinfectantes o vacunas, o incluso tratamiento con determinadas sustancias. Todos ellos son procedimientos que han demostrado ser poco efectivos, como veremos más adelante.

Para el diagnóstico del virus en peces enfermos se usa el aislamiento en cultivo celular, seguido de identificación con técnicas serológicas como seroneutralización (SNT) o ELISA (OIE, 2000). Para los mayores niveles de

sensibilidad requeridos para la detección del virus en portadores asintomáticos, es necesario el uso de la RT-PCR (Dopazo & Barja, 2002).

Tabla 3. Distribución geográfica del virus IPNV.

Continente	País	Referencia
América	Estados Unidos	Wood et al. (1955)
		Wolf et al. (1959)
	Canadá	Mac Kelvie & Astrob (1969)
	Chile	McAllister & Reyes (1984)
Asia	Japón	Sano (1971a)
	Corea	Hah et al. (1984)
	Taiwan	Hedrick et al. (1983)
Europa	Dinamarca	Jørgensen & Brengballe (1969)
	Inglaterra	Hill (1982)
	Francia	Besse & Kinkelin (1965)
	Alemania	Schlotfeldt et al.(1975)
	Grecia	Carlson, no publicado
	Italia	Ghittino (1972)
	Noruega	Harstein & Krogssud(1976)
	Escocia	Ball et al.(1971)
	Suecia	Ljungberg & Jørgensen(1973)
	Yugoslavia	Fijan (1974)
	España	Ledo et al.(1987, 1990)
	Portugal	Sousa et al.(1996)
Africa	Sudáfrica	Bragg & Combrink(1987)
Oceanía	Australia	Crane et al.(2000)

B - Familia Rhabdoviridae

Otra familia de virus de interés en la acuicultura es la familia *Rhabdoviridae*, que incluye varios virus productores de importantes enfermedades de peces; entre ellos, los de mayor incidencia son el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) y el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV), sobre los que haremos mayor hincapié, aunque describiremos también algunos otros rabdovirus de interés, como el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVC).

Características del agente viral

Los virus de esta familia tienen una morfología característica; no en vano el nombre de la familia hace referencia a su forma de bala. Son virus envueltos, con nucleocápside helicoidal, de un tamaño de 60 a 75 nm de

diámetro y una longitud de alrededor de 170 nm, cuya envuelta lipídica tiene un espesor de unos 10 nm (Darlington et al., 1972; De Kinkelin & Scherrer, 1970). Su genoma está constituido por RNA monocatenal de un tamaño de 3,7 x 10^6d, que se transcribe en 5 clases de RNA mensajero que dan lugar a 5 proteínas estructurales del virión, que se denominan **L** (polimerasa), **G** (glicoproteína), **N** (nucleoproteína), **M_1** y **M_2** (proteínas matriciales), y una proteína no estructural (**Nv**). Los viriones son muy inestables a diversas condiciones, como al calor, al tratamiento con éter y ácidos, e incluso a algún tratamiento para microscopía electrónica.

Características de la enfermedad

a) Necrosis hematopoyética infecciosa

La necrosis hematopoyética infecciosa (IHN) es una enfermedad sistémica aguda, que afecta a peces salmónidos jóvenes, se transmite fundamentalmente vía vertical, aunque también a través del agua contaminada (Wolf, 1984). La enfermedad se consideraba enzoótica del noroeste de EE.UU; sin embargo, ya se ha aislado en algunos países europeos.

El virus de la necrosis hematopoyética infecciosa provoca altas mortalidades, fundamentalmente en alevines, los cuales muestran natación anormal, con movimientos bruscos y aleatorios. Los peces afectados evitan las corrientes de agua y nadan por los laterales de los tanques; en estado terminal se muestran completamente estáticos, pero ante cualquier movimiento recuperan repentinamente el vigor, escurriéndose con gran velocidad para, casi inmediatamente, caer muertos en el fondo del tanque. Al contrario que en el caso de la necrosis pancreática infecciosa, son los alevines de mayor tamaño los que parecen sufrir la enfermedad antes y con mayor crudeza.

Entre los síntomas externos se incluye el oscurecimiento de la piel, ligera exoftalmia, distensión abdominal, hemorragias en la base de las aletas, agallas pálidas y petequias a lo largo del cuerpo y en la boca. Otro síntoma externo característico es la presencia de hilos fecales o pseodofecales, blanquecinos, de mayor grosor y consistencia que en el caso de los presentados por los peces afectados por IPNV. El aspecto general interno es anémico, e incluso algunos individuos presentan los laterales comprimidos, debido a este estado anémico y al debilitamiento de la musculatura.

Una alteración histopatológica característica de esta infección es, como el propio nombre de esta enfermedad indica, la presencia de lesiones necróticas en el tejido hematopoyético renal. La enfermedad también provoca necrosis en riñón, páncreas y tracto gastrointestinal. Una histopatología descrita como exclusiva de este virus es la producción de necrosis en las células granulares del tracto digestivo (Wolf, 1988; Bootland & Leong, 1999). La enfermedad es altamente contagiosa, con transmisión de alta eficiencia tanto horizontal como vertical. Además, se ha demostrado la existencia de portadores asintomáticos, que representan uno de los mayores riesgos de dispersión de la enfermedad. No existe tratamiento disponible, y el único procedimiento válido es la desinfección de los huevos, así como el diagnóstico precoz. Para el diagnóstico, oficialmente está indicado el aislamiento en

cultivo celular, seguido de la identificación mediante SNT, ELISA o hibridación de ácidos nucleicos. Además, existen numerosas publicaciones sobre el uso de la PCR para diagnóstico de este virus (Winton & Einer-Jensen, 2002).

b) Septicemia hemorrágica viral

La septicemia hemorrágica viral (VHS) es una enfermedad aguda o crónica, provocada por un rabdovirus denominado VHSV o virus Egtved. Originalmente fue aislado en trucha arco iris (Jensen, 1965), aunque desde entonces se ha aislado de numerosas especies de peces, especialmente marinos, tanto salvajes como cultivados (Skall et al., 2005). Dicha enfermedad, que afecta a peces de todas las edades; provoca mortalidades entre moderadas y altas en peces salmónidos, y ha causado epizootias en ejemplares adultos de rodaballo cultivado (Ross et al., 1994). Un aspecto importante es la baja virulencia del virus a altas temperaturas, lo cual parece estar mediado por la producción de interferón en el pez (De Kinkelin et al., 1982), aunque también puede tener relación con la estabilidad del virus. El virus VHSV se transmite horizontalmente a través de las agallas y, al contrario que con el virus IHNV, no se ha podido demostrar su transmisión vertical.

La enfermedad afecta fundamentalmente a temperaturas entre 4 y 14ºC; comienza de modo crónico, con mortalidades bajas pero persistentes, pasando a un estado agudo, con altas mortalidades (Snow & Smail, 1999; Smail, 1999). Parte de la sintomatología externa puede confundirse con la de la necrosis hematopoyética, caracterizándose por períodos de inapetencia de los peces y alternando fases letárgicas y de hiperactividad. Además, los peces presentan un aspecto anémico, distensión abdominal, oscurecimiento de la piel y exoftalmia en uno o ambos ojos, además de hemorragias en ojos, piel, agallas y base de las aletas. El intestino aparece vacío y la musculatura de las paredes abdominales muestra petequias.

Los órganos y tejidos con mayores alteraciones histopatológicas son hígado, riñón, bazo y músculo. Sin embargo, el órgano diana es el riñón y, por lo tanto, es el que muestra alteraciones más aparentes, con degeneración y necrosis del tejido hematopoyético. El hígado es también un blanco importante de este virus, con aparición de necrosis focales y vacuolización de las células hepáticas, entre otras alteraciones.

La transmisión horizontal está demostrada, no así la vertical, siendo la principal via de entrada la base de las aletas, motivo por el cual suelen comenzar los síntomas en esos puntos. No existe tratamiento específico y, aunque se trabaja intensamente en el diseño de nuevas vacunas, tampoco se dispone de ninguna específica, por lo que se debe recurrir, como con la mayoría de las enfermedades virales en Acuicultura, al seguimiento continuado y el diagnóstico precoz del virus. Para ello se emplea el aislamiento en cultivo celular y la identificación fundamentalmente con inmunofluorescencia (IFA), aunque la PCR es una técnica cada vez más aceptada (Smail, 1999; Winton & Einer-Jensen, 2002).

c) Viremia primaveral de la carpa y otras enfermedades por rabdovirus

La viremia primaveral de la carpa es una enfermedad hemorrágica aguda y altamente contagiosa, distribuida por el continente europeo. Afecta a carpa común *Cyprinus carpio*, carpa herbívora, carpa dorada y a tenca. Aunque afecta a peces jóvenes y adultos, son los más jóvenes los más sensibles. Las epizootias se producen fundamentalmente entre los meses de abril y junio, cuando la temperatura del agua está entre 11 y 17°C. Los síntomas son: edema, hemorragias, ampollas en la piel y presencia de lesiones en bazo, riñón, hígado y corazón. Se transmite vía horizontal a través del agua, heces, branquias y mucus, así como por sedimentos acuáticos, que actúan como reservorios. Para su diagnóstico se aplica aislamiento en cultivo celular e identificación por SNT, IFA o ELISA. Para su prevención se aconsejan medidas de higiene, así como aplicación de programas de monitorización y vigilancia.

Otros rabdovirus de menor transcendencia, o de reciente descripción son: El rabdovirus de anguila, que es del tipo vesiculovirus y que provoca úlceras muy contagiosas en anguila en países asiáticos (Frerichs et al., 1989); el rabdovirus de trucha provoca mortalidades de bajo grado (Koski et al., 1992), desarrollando síntomas, tanto externos como internos muy similares a los provocados por VHSV o IHNV; el rabdovirus de perca provoca altas mortalidades en alevines a 17°C (Nougayrede et al., 1992).

C - Familia Paramyxoviridae

Los paramixovirus son virus envueltos, de un tamaño de 80 y hasta 300 nm de diámetro; son pleomórficos, pudiendo mostrar un aspecto esférico, oval o irregular. Presentan espículas que recubren su superficie.

Esta familia contiene pocos virus de peces y todos ellos aislados muy recientemente. Una de las primeras cepas aisladas hasta el momento se detectó en Galicia en 1992; se trata del paramixovirus de rodaballo, aislado a partir de rodaballo afectado por un síndrome que estaba provocando mortalidades muy altas (Cepeda et al., 1993); los peces afectados mostraban numerosas hemorragias en la boca, base de las aletas y ano. El síndrome, además, era altamente contagioso y afectaba a peces de todas las edades. Una importante característica de este virus es su capacidad de replicar en eritrocitos de peces, siendo uno de los pocos virus que poseen esta caracteristica.

También por esas fechas se detectó el paramixovirus de lubina americana, que provoca necrosis epidérmica en larvas (llegando hasta el 100% de mortalidad) y afecta a la epidermis de aletas, agallas, intestino y mucosa oral en juveniles (Hetrick & Hedrick, 1993). Posteriormente se detectó este tipo de virus en Noruega, en salmón atlántico con alteraciones histológicas en agallas, aunque las mortalidades no eran marcadamente altas (Kvellestad et al., 2003). Mas recientemente, Watanabe et al. (2006) detectaron la presencia de paramixovirus asociado al síndrome inflamatorio de músculo esquelético en esta misma especie.

D - Familia Orthomyxoviridae

La anemia infecciosa del salmón (ISA) es una enfermedad viral que provoca graves mortalidades e importantes pérdidas económicas en las piscifactorías afectadas. Aunque también puede afectar a trucha, es una enfermedad típica del salmón, que se ha detectado en Noruega, Escocia, noreste de Canadá, y que recientemente se ha demostrado que también está presente en ciertas zonas de Chile (Bouchard et al., 2001; Kibenge et al., 2001; ICES, 2003; Plarre et al., 2005).

Los peces afectados sufren letargia y se acumulan en las paredes de los tanques; en estadios avanzados se desplazan al fondo; además, el estado anémico puede hacerles aparecer extremadamente delgados. Las agallas aparecen pálidas, e hígado y bazo extremadamente oscurecidos; el estómago se muestra hinchado y lleno de un líquido viscoso, y la cavidad peritoneal llena de líquido ascítico. Presentan petequias en grasa visceral y estomacal, y a veces en la musculatura esquelética (Dannevig & Thorud, 1999). El virus se transmite vía horizontal, a través del agua, la piel, mucus, orina y heces, y entra a través de heridas en la piel y por las agallas; se cree que también podrían intervenir determinado tipo de vectores, como pulgas de mar.

No existe ningún tratamiento efectivo, y lo único realmente aconsejable es la destrucción del stock de peces. En algunos casos se ha empleado, con cierto éxito, una estrategia consistente en mantener en ayuno a los peces afectados durante 2 días, para, acto seguido, administrar alimento con un choque vitamínico.

El diagnóstico se basó en un principio en la identificación de la sintomatología y en la aplicación de inmunofluorescencia mediante anticuerpos monoclonales, aunque recientemente se ha comenzado a emplear, con mejores resultados, la técnica de la transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (Mjaaland et al., 2002).

E - Familia Iridoviridae

Esta familia contiene virus detectados tanto en invertebrados como en vertebrados poiquilotermos. Es bien conocido el papel de los iridovirus, y partículas semejantes a iridovirus, como causantes de quistes linfoides y de alteraciones de los eritrocitos, virus que trataremos en este capítulo; sin embargo, hasta hace poco no se consideraba a estos virus como causantes de enfermedades sistémicas graves. En la actualidad se conoce un mayor número de iridovirus causantes de diversos síndromes en peces; estos virus se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Iridovirus de peces.

Virus	Huésped	Tejido	Distribución
Linfocistis	Marinos/Agua dulce	Epidermis	Europa y Asia
Necrosis de aleta en carpa	Carpa común	Aleta	Rusia
Virus ulcerativo de bacalao	Bacalao	Epidermis	Europa
Necrosis hematopoyética epizoótica (EHNV)	Perca, pez gato, trucha, otros	Sistémica	Australia Europa
Iridovirus de anguila	Anguila	Sistémica	Japón
Iridovirus de esturión blanco	Esturión	Mucosas	USA
Necrosis eritrocitaria	Anádromos	Eritrocitos	Mundial
Iridovirus de rodaballo	Rodaballo	Sistémico	Europa
Iridovirus de dorada japonesa	Dorada, lubina, seriola	Sistémica	Japón, Tailandia
I. de la enfermedad de las pústulas	Gruper	Epitelial	Tailandia

CC: aislamiento en cultivo celular; ME: detección por microscopía electrónica.

Las enfermedades provocadas por este tipo de virus son de distribución mundial, aunque fundamentalmente asociadas a aguas cálidas. En España, la primera descripción de la detección de un iridovirus se produjo en 1990, aunque la epizootia se había detectado en 1988 (Basurco et al., 1990).

Características del virus

Los iridovirus son virus de simetría icosaédrica, con envueltas que no provienen de la membrana de las células infectadas (Kelly & Robertson, 1973). Su genoma está contituido por DNA bicatenario de gran tamaño (50 µm en el caso del genoma del linfocistis). El tamaño de la partícula varía dependiendo de la cepa de que se trate, desde 110 hasta 500 nm, aunque los tamaños normales están en el orden de los 110 a 150 nm (Johnston, 1975). Son virus sensibles a éter y solventes lipídicos, así como al tratamiento a altas temperaturas.

Características de la enfermedad

a) Necrosis eritrocitaria viral

La necrosis eritrocitaria viral está provocada por un iridovirus (VEN) que afecta a numerosas especies de animales poiquilotermos, aunque principalmente a especies marinas anádromas. Algunos de los peces marinos afectados son lubina, salmón, anguila, bacalao y seriola, en los cuales provoca bajas mortalidades; sin embargo, los peces afectados son mucho más sensibles a infecciones por otros microorganismos, infecciones que sí

llegan a producir altas mortalidades. El virus está ampliamente distribuido por todo el mundo, y se ha detectado tanto en Portugal como España.

Como síntomas externos se observa obscurecimiento de la piel y palidez de las agallas y órganos internos. Los mayores cambios histopatológicos se detectan a nivel de los eritrocitos, en los cuales el virus VEN provoca necrosis; los eritrocitos de peces afectados presentan inclusiones citoplasmáticas de DNA viral, y muestran un aspecto redondeado e irregular, además de mayor fragilidad; el núcleo se halla deformado y desplazado; la membrana celular está intacta, pero la cromatina se desplaza a la periferia, adoptando el aspecto de una vacuola intracelular (Mac Millan et al., 1980; Reno & Nicholson, 1981).

Aunque algunos autores han propuesto diversos mecanismos de transmisión, tanto vertical (Rohovec & Amandi, 1981) como horizontal (Smail, 1982), e incluso mediante ectoparásitos como el piojo del salmón, se desconoce el verdadero/s mecanismo/s de transmisión en condiciones naturales.

b) Linfocistis

El virus de los quistes linfoides o linfocistis provoca una infección crónica o benigna caracterizada por hipertrofia de las células de la epidermis y/o de las aletas (Wolf, 1988; Williams, 1996). Esta enfermedad está ampliamente distribuida por todo el mundo, y afecta a una gran variedad de especies de peces, tanto marinos como de agua dulce. Los peces afectados muestran nódulos visibles en la superficie del cuerpo, pasando posteriormente a los órganos y tejidos internos; no presentan un comportamiento especial, aunque en estados avanzados de la infección se puede observar cierta dificultad en la actividad natatoria. A nivel histopatológico, el virus provoca hipertrofia celular (las células aumentan hasta 10 veces de tamaño). A nivel del núcleo celular se producen cambios degenerativos, como la disolución del nucleolo, y condensación y fragmentación de la cromatina. En el citoplasma aparecen cuerpos de inclusión constituidos por viriones de morfología icosaédrica. Aunque la enfermedad no es mortal, el deterioro de los peces, fundamentalmente de su aspecto, dificulta su comercialización.

La transmisión del virus del linfocistis se produce a través de las aguas contaminadas y de las heridas de la piel. A nivel experimental se ha transmitido esta enfermedad a especies de peces de un mismo género, pero no de familias distintas, lo que sugiere la existencia de distintos tipos específicos de linfocistis. No existe tratamiento, y para su diagnóstico se emplea, principalmente, el análisis de la sintomatología, además de microscopía electrónica (ME) y PCR.

c) Necrosis hematopoyética epizoótica

El virus de la necrosis hematopoyética epizoótica (EHNV) se detectó por primera vez en una epizootia dentro de una población natural de perca de cola roja *Perca fluviatilis* (Langdon & Humphrey, 1987), en la cual había provocado altas mortalidades; tras este primer aislamiento, este virus se ha detectado en epizootias que afectan a otras especies de peces, como pez

gato y trucha, entre otros. La enfermedad afecta fundamentalmente a alevines y a individuos de hasta 12 cm, provocando mortalidades bajas a moderadas. Los órganos diana son el riñón y el bazo, afectando concretamente al tejido hematopoyético, en el que provoca necrosis. Los adultos que han sobrevivido a una epizootia de este tipo muestran una clara infección crónica, aunque no está claro que puedan actuar como portadores típicos diseminando la enfermedad. La transmisión es horizontal, a través del agua de lotes infectados. No existe tratamiento ni vacuna, por lo que el control se basa en el seguimiento y diagnóstico, empleando aislamiento en cultivo celular, IFA, ELISA o PCR.

F - Familia Picornaviridae

Esta familia está constituida por virus de simetría icosaédrica, no envueltos, de un pequeño tamaño (de 28 a 30 nm), y cuyo genoma es RNA monocatenal de 7 a 8 Kb. Al microscopio electrónico suelen observarse estructuras cristalinas formadas por la acumulación de innumerables partículas virales.

Hasta hace poco no se conocían más que unos pocos picornavirus de animales acuáticos, aunque en los últimos años ha incrementado el número de aislamientos y detección de virus de este tipo. El primer picornavirus se aisló en el año 88 a partir de eperlano en Canadá (Moore et al., 1988), aunque este virus no desarrollaba ninguna sintomatología en los peces infectados, incluso a nivel experimental. Más tarde, Ahne et al. (1990) detectaron, también en eperlano, un virus semejante en lesiones de aspecto tumoral.

Se han detectado picornavirus en peces salmónidos en cultivo, que habrían sobrevivido a una epizootia moderada sin etiología definida. Hedrick et al. (1991) lo aislarían a partir de fluido ovárico de diversas especies de trucha. También se observaron partículas tipo picornavirus en áreas degenerativas de cerebro y retina de larvas de barramundi (*Lates calcarifer*) en una planta de cría que estaba sufriendo mortalidades del 50 al 90% (Glazebrook et al., 1990). También se ha publicado la presencia de este virus asociado a mortalidades en grouper con síntomas de encefalopatía espongiforme en Tailandia (Boonyaratpalin et al., 1996).

G -Familia Nodaviridae

Los virus de esta familia estuvieron durante unos años incluidos dentro de la familia *Picornaviridae* (Renault et al., 1991) puesto que, al igual que estos, los nodavirus son virus no envueltos de morfología icosaédrica y con un tamaño de 25 a 30 nm. Sin embargo, debido a las diferentes propiedades de sus proteínas y su ácido nucleico Munday et al. (1991) propusieron la inclusión de estos virus dentro de la familia *Nodaviridae*, aunque claramente diferenciados de los nodavirus de insectos (Comps et al., 1994).

Los nodavirus producen distintos tipos de síndromes que, en general, se agrupan dentro de dos tipos de denominación: encefalopatía y retinopatía vacuolizante (ERV), o necrosis nerviosa viral (NNV). Los nodavirus afectan a más de 30 especies de peces diferentes y provocan grandes pérdidas en la acuicultura marina de todo el mundo (Munday et al., 2002), hasta hace poco

en Europa las principales pérdidas se centraban en larvas y juveniles de dorada y lubina, pero en los últimos años también están causando problemas en el cultivo del lenguado en España y Portugal (Cutrín et al., 2007). Algunos de los síntomas observados son alteración de la pigmentación de las larvas, reducción de la alimentación, lo que hace que el intestino aparezca transparente; en juveniles la piel aparece oscurecida; además se observa natación errática y espiral en los primeros estados de la enfermedad, y ya más avanzada, las larvas y juveniles pasan a un estado letárgico, con espasmos temporales. Las mortalidades pueden llegar al 100% en las larvas. En el caso de NNV, los primeros síntomas observados son también la alteración del comportamiento de los peces, alteración que es muy similar a la de ERV (natación en espiral y períodos de letargia). Histopatológicamente, el virus provoca vacuolización de las células nerviosas y del tejido retinal.

Se ha comprobado que el virus se transmite vía horizontal (Mori et al., 1991), desde peces afectados a sanos, e incluso se supone que el origen de esta enfermedad podría ser la contaminación de peces de cultivo por peces salvajes contaminados. Aunque se ha comprobado la presencia del virus, con relativa frecuencia, en los ovarios y en huevos fecundados, hasta el momento no se ha podido comprobar la transmisión vertical.

H - Familia Herpesviridae

Los herpesvirus son virus de nucleocápside icosaédrica de 100 nm de diámetro, rodeados de un tegumento de material amorfo y una envuelta con proyecciones en su superficie. Su tamaño global es de 150 a 200 nm. Su genoma es de DNA bicatenal de un tamaño de 120 a 200 Kb.

La familia *Herpesviridae* está ampliamente representada entre las enfermedades que pueden afectar a diversas especies de peces (Tabla 5). Aunque muchos de ellos no fueron aislados de peces enfermos, los herpesvirus más conocidos son el herpesvirus de siluros (CCV, Channel Catfish Virus) (Fijan, 1968) y los herpesvirus de salmónidos, como el HS (*Herpesvirus salmonis*) (Wolf et al., 1978), el OMV (*Oncorhynchus masou* virus) y el NeVTA (Kimura et al., 1981), CCV y HS provocan enfermedades agudas, con altas mortalidades; sin embargo, los herpesvirus de salmónidos japoneses (OMV y NeVTa) son virus de tipo oncogénico.

El virus CCV se transmite horizontalmente, por el contacto con el agua contaminada o por peces muertos (Plumb, 1977). Los peces afectados padecen anorexia, y alternan fases de estado letárgico, con momentos de natación en espiral y convulsiva en la superficie del agua; presentan exoftalmia y distensión abdominal, además de hemorragias en la base de las aletas, agallas y ano. Los órganos internos aparecen hiperémicos, aunque hígado y riñón presentan un aspecto pálido. Los mayores cambios histopatológicos se observan a nivel de riñón, hígado y tracto digestivo.

El *Herpesvirus salmonis* se transmite tanto horizontal como verticalmente. Al comienzo del desarrollo de la infección, los peces, fundamentalmente alevines, se muestran hiperactivos, aunque pronto pasan a un estado letárgico, llegando a mortalidades del 50 y hasta el 100%. Los peces presentan aspecto anémico, con oscurecimiento de la piel, palidez en las agallas, distensión abdominal y exoftalmia. Internamente, el tracto digestivo se encuentra vacío, y aparece moteado hiperémico en hígado,

corazón y bazo. A nivel histopatológico se observa necrosis del tejido hematopoyético y túbulos renales, además de edemas en corazón, bazo y cerebro (Wolf & Taylor, 1975).

En el caso de OMV y NeVTa, los síntomas externos son semejantes a los anteriormente citados, aunque no se detecta mortalidad significativa. El riñón es el órgano diana, observándose la formación de sincitios e inclusiones citoplasmáticas, además de necrosis en los túbulos. Asimismo, se observa vacuolización de las células acinares pancreáticas (Sano, 1976; Kimura et al., 1981).

En los últimos años se han detectado epizootias graves provocadas por herpesvirus en trucha lacustre *Salvelinus namaycush* (McAllister & Herman, 1989), esturión blanco *Acipenser transmontanus*, pez ángel *Pterophyllum altum* (Mellergard & Bloch, 1988), anguila europea *Anguilla anguilla* (Davidse et al., 1999) y anguila japonesa *A. japonica* (Ueno et al., 1992). También se han detectado nuevos herpervirus asociados con hiperplasias y necrosis epidérmicas en peces juveniles y larvas de platija y esturión blanco (Iida et al., 1989).

Otro herpesvirus es el virus de la enfermedad epizoótica epiteliotrópica, que se detectó inicialmente en la región de los Grandes Lagos en 1988 (Bradley et al., 1988), y que provoca mortalidades epizoóticas en truchas juveniles, mortalidades que pueden alcanzar hasta el 99% de los peces. Uno de los síntomas más claros de esta enfermedad es la aparición de motas mucoides en la piel, que acaban contaminándose con clamidias.

En la actualidad, uno de los herpesvirus de mayor preocupación es el herpesvirus de carpa koi (KHV) (Hedrick et al., 2005; Ilouze et al., 2005), que afecta a carpa común y carpa Koi de todas las edades, y ha sido detectado en numerosos países europeos y asiáticos, así como en Estados Unidos. En agua con la temperatura óptima del virus (entre 22 y 27ºC), provoca mortalidades entre el 80% y el 100% en tan solo 2 semanas tras la infección. Los peces afectados muestran lesiones en las agallas (con manchas blanquecinas y sanguinolentas) y pústulas en la piel, además de natación letárgica y desorientada. El virus es persistente, lo cual es un factor de riesgo, y se transmite por contacto, a través del agua, el barro o la manipulación por los operarios. El mejor método de prevención es la cuarentena, el control de la manipulación y el establecimiento de planes de seguimiento continuado. El diagnóstico está basado en el aislamiento en cultivo celular, ELISA, ME y PCR.

Tabla 5. Herpesvirus de peces.

Virus	Especie	Localización	Enfermedad
Herpesvirus salmonis (HS)	Trucha	USA	Experimental
NeVTA	Salmón "nerka"	Japón	SI
Herpesvirus de salmón "masou"	Salmón "masou"	Japón	Experimental
Herpesvirus de pez gato (CCV)	Pez gato	América	SI
Herpesvirus cyprini	Carpa	Japón	Experimental
Herpesvirus anguillae	Anguila	Japón y Taiwan	SI
Herpesvirus de esturión	Esturión blanco	USA	SI
Koi herpesvirus (KHV)	Carpa	Mundial	SI

CCV: Channel Catfish Virus.

I - Familia Retroviridae

Los viriones de retrovirus están constiuidos por una cápside icosaédrica que probablemente contiene una nucleocápside helicoidal, y todo este conjunto está rodeado por una envuelta lipídica. Los viriones tienen un tamaño de 80 a 130 nm y su genoma está constituído por dos moléculas idénticas de RNA monocatenario. Su característica más importante es la de poseer un enzima de actividad especial, una reverso-transcriptasa.

Los piscicultores saben que dentro de las poblaciones que mantienen en cultivo suele haber peces que muestran lesiones tipo tumoral; sin embargo, hasta el momento sólo se han descrito unos pocos retrovirus asociados a ese tipo de lesiones, como el linfosarcoma en lucio *Esox lucius*, (Papas et al., 1976) o el fibrosarcoma en salón atlántico *Salmo salar* (Duncan, 1978). En 1976 Yamamoto et al describieron un síndrome provocado por el virus del sarcoma dérmico en "walleye" *Stozostedion vitreum vitreum*, caracterizado por la formación de tumores que afectan al 25% de peces adultos; estos tumores eran infecciosos, y aparecían en primavera, para desaparecer en verano, de modo que se deducía que la temperatura afectaba a la incidencia del síndrome; histológicamente estos tumores parecen malignos, pero no son ni invasivos ni metásticos. Otro retrovirus es el de la leucemia plasmocitoide en salmón, que puede provocar mortalidades de hasta el 80% en algunos casos; hasta ahora sólo se ha detectado en salmón chinook (Newbound & Kent, 1991), aunque se ha transmitido experimentalmente a salmón "coho", salmón atlántico, salmón sockeye y trucha arco iris.

J - Familia Togaviridae

Dentro de esta familia se incluyen, agrupados bajo el nombre genérico de “Salmonid Alphavirus” (SAV), a los virus de la enfermedad del sueño (“sleeping disease virus”, SDV) y de la enfermedad del páncreas (PD), incluyendo éste 3 subtipos: el “salmon páncreas disease virus” (SPDV o SAV 1), el “salmon disease virus” (SDV o SAV 2) y más recientemente el Norwegian salmonid alphavirus (NSAV o SAV 3) (McLoughlin & Graham, 2007). Los togavirus son virus de RNA monocatenal de cadena positiva, con envuelta lipídica, esféricos, aunque ligeramente pleomórficos, y de un diámetro de unos 70 nm, con nucleocápside de 40 nm. Estos virus afectan a salmónidos en cultivo en Irlanda, Escocia y Noruega, aunque también se ha publicado algún caso en Francia y España, así como en EE.UU. Provoca mortalidades moderadas (del 10% al 50%), pero el mayor problema se debe al extremado retraso del desarrollo, aunque puede ir acompañado de alta mortalidad al cabo de unos cuantos meses (Dannevig & Thorud, 1999). La mortalidad es superior en la época de primavera-verano, debido al incremento de la temperatura, aunque en invierno mantiene una morbilidad moderada a alta. Los peces afectados muestran natación errática, anorexia, letargia y crecimiento ralentizado, además de oscurecimiento de la piel, hemorragias petequiales en grasa (y ciegos pilóricos en el caso de SDV), la cual se encuentra además reducida, y el aparato digestivo aparece vacío. El virus se transmite vía horizontal por contacto y se desconoce si existe algún tipo de reservorio natural.

El diagnóstico no es sencillo. En un principio se aplicaba simplemente la identificación de los síntomas; sin embargo, este grupo de síntomas es muy semejante a los desarrollados por el virus IPNV, y ligeramente parecido a las de ISA; por ello, era imprescindible demostrar la ausencia de estos. En la actualidad se trabaja con la técnica de RT-PCR y la PCR en tiempo real (McLoughlin, 1997; Villoing et al., 2000; Hodneland & Endresen, 2005).

No existe ningún tratamiento efectivo contra el virus, y en la actualidad se trabaja en el diseño de una vacuna. Mientras tanto, el único método con cierto éxito consiste en detener la alimentación de los lotes afectados, lo cual reduce ligeramente la severidad característica de esta enfermedad.

Control de enfermedades virales en acuicultura

Las enfermedades virales son de difícil control y hasta la fecha no se conoce ningún método de prevención ni tratamiento que sea absolutamente efectivo. Por ello, es precisa la aplicación de medidas que reduzcan, en la medida de lo posible, los riesgos de contagio y de dispersión de este tipo de infecciones. El conocimiento y aplicación, por parte del piscicultor, de tales medidas reducirá el riesgo de expansión de este tipo de enfermedades, cada vez de más incidencia en la acuicultura.

En este capítulo estudiaremos algunas medidas básicas para el control de enfermedades virales; a continuación abordaremos algunos de los métodos tradicionales y más modernos de diagnóstico de las enfermedades virales, apartado que se podría considerar como otro tipo de medidas de control; finalizaremos con el estudio de la línea del tratamiento de las enfermedades virales.

Métodos de prevención

A - Manipulación y control

Evitar el virus es la forma más efectiva y económica de controlar cualquier enfermedad viral. Este planteamiento requiere el control de todas las posibles fuentes de contaminación, lo cual implica que la limpieza de la piscifactoría debe considerarse seriamente como un método de prevención. Además, los trabajadores deben tener consciencia de que su trabajo puede ser una de las principales causas de dispersión de infecciones virales dentro de las plantas de cultivo. Por ello, es importante que el piscicultor acepte su parte de responsabilidad y acate las más mínimas normas de higiene en el trabajo, incluyendo la limpieza de los zapatos cuando se cambia de sala de cultivo, el cambio de guantes al manipular peces de distintos lotes y/o estanques, desinfectar los utensilios empleados en la manipulación de los peces, e incluso la desinfección de manos antes de manipular peces de un tanque.

Una práctica habitual en las piscifactorías es mantener en cultivo aquellos peces que han sobrevivido a una epizootia viral, hasta tal punto que llegan a utilizarlos como reproductores para obtener nuevos stocks. Estos stocks sufren frecuentemente la enfermedad, causando graves pérdidas económicas debido a que los progenitores, aunque no presentan los síntomas, habitualmente son portadores del virus. Este ejemplo evidencia la importancia de llevar a cabo análisis periódicos aplicando técnicas de diagnóstico que permitan detectar la presencia de virus en los reproductores, para evitar, en lo posible, la transmisión vertical. En la actualidad, gracias a la puesta a punto de la detección de virus en muestras de sangre (Cutrín et al., 2005; López-Vázquez et al., 2006; Olveira et al., 2008), es posible la detección no letal de virus y, por tanto, la selección de reproductores no portadores de virus de riesgo. Por otro lado, en el caso de detección de lotes infectados por virus, la mejor medida es eliminar los stocks contaminados, desinfectar la instalación y el material empleado en la manipulación de los peces (incluso objetos personales como botas y trajes de aguas).

Otro punto importante es la utilización de desinfectantes para el tratamiento previo de los huevos y alevines que constituirán los futuros lotes de cultivo. En los casos en que se trabaje con stocks de peces infectados con virus que se transmiten verticalmente, el tratamiento de los huevos fecundados con compuestos yodados suele ser bastante efectivo. Aunque el empleo de desinfectantes como el formol, cloro, alcoholes, etc, no elimina completamente los virus, su utilización reduce considerablemente el riesgo de transmisión de los mismos, por lo que es aconsejable su utilización, fundamentalmente para la desinfección de los utensilios de manipulación. Los desinfectantes que se pueden utilizar en las plantas de cultivo son, entre otros, cloro (habitualmente en forma de hipoclorito sódico o cálcico), hidróxido sódico, verde malaquita, formol, yodo e isopropanol. En algunas instalaciones se trata el agua con radiaciones ultravioleta u ozono.

Debemos hacer mención especial a una práctica habitual entre los que diseñan las piscifactorías, que suelen preocuparse más por el ahorro de energía o la comodidad de diseño, que por la aplicación de la lógica para evitar la dispersión de los virus por toda la piscifactoría. Así, se deben evitar

los diseños de flujo de agua en serie, que favorecen que si los peces de un tanque sufren una infección, la transmitan a los siguientes tanques en la línea de flujo de agua; por ello, el flujo de agua debe ser en derivación, es decir, de tal modo que todos los tanques tengan agua independiente. Por otro lado, la salida del agua de los tanques debe pasar por una fase de desinfección, para evitar, en la medida de lo posible, la dispersión de las infecciones al medio ambiente.

Miembros de nuestro equipo (Ledo et al., 1990) diseñaron un método de control de importaciones que reducen el peligro de contaminaciones por el virus IPNV (Figura 1). Se trata de tomar una muestra de los huevos fecundados importados y dividirla en dos submuestras. Una de ellas se procesa para diagnóstico viral, mientras que la otra se incuba para permitir el desarrollo de los huevos y obtención de los alevines, los cuales, a continuación, se procesan para diagnóstico viral. Paralelamente, los huevos fecundados restantes se han mantenido en cuarentena en la piscifactoría receptora. De esta manera se asegura que el diagnóstico final y certificación de calidad de la importación es lo suficientemente fiable como para aconsejar la transferencia de los alevines a los tanques de engorde, o para la destrucción del stock y establecimiento de las medidas legales subsecuentes.
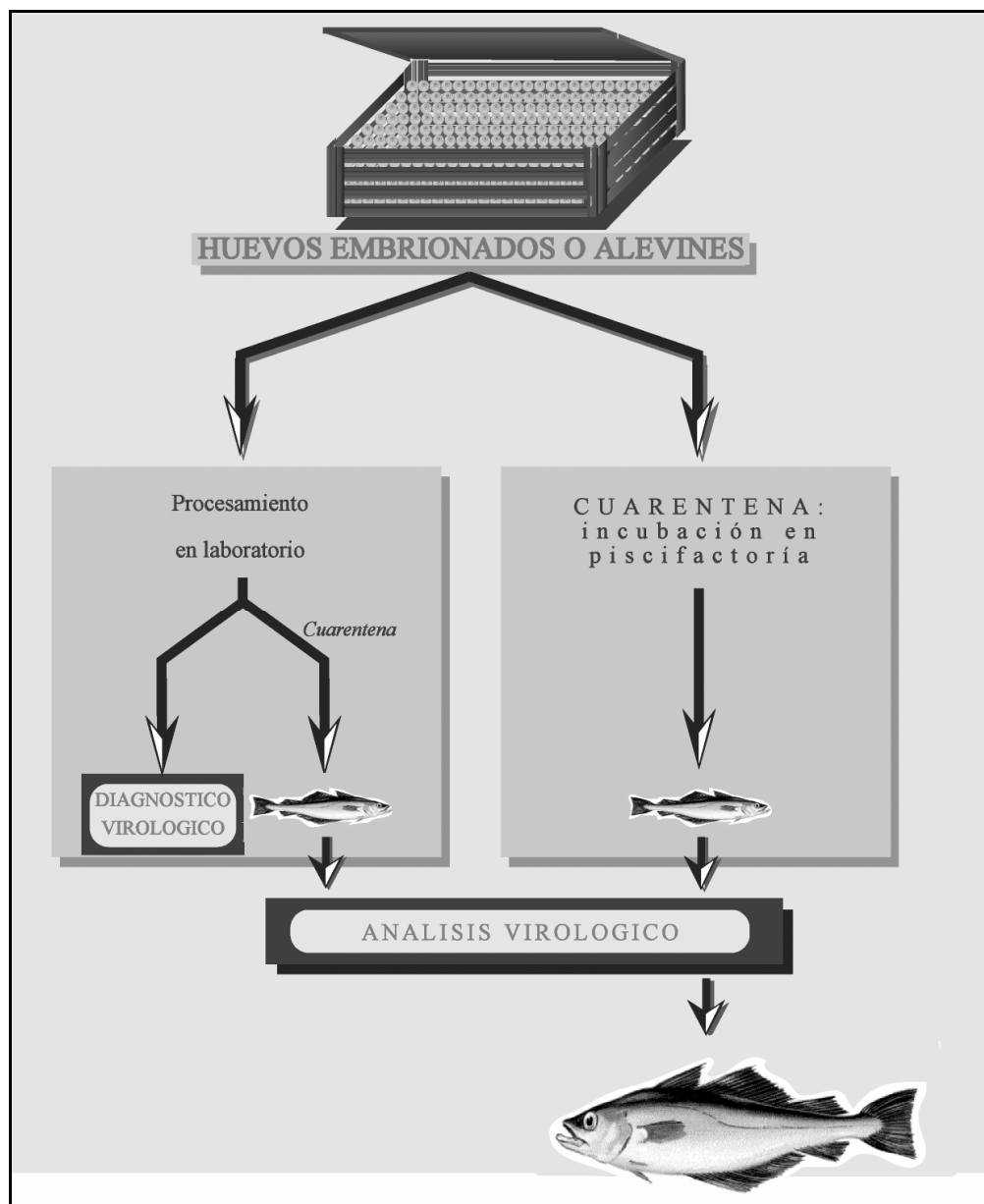
Figura 1. *Control de importaciones: cuarentena*

B – Vacunas

Así como para la prevención de enfermedades bacterianas está ampliamente extendido el uso de vacunas, en el caso de las enfermedades virales la vacunación no ha pasado del nivel experimental, entre otros motivos por el elevado coste de la producción de vanunas contra virus, pero también debido a la gran variabilidad de tipos distintos que se pueden

encontrar dentro de cada grupo viral, y por la gran facilidad que los virus poseen de cambio antigénico.

La vacuna ideal contra cualquier enfermedad viral de peces debería ser: inocua (para que no desarrolle síntomas de la enfermedad que se pretende prevenir), eficaz (protegiendo al pez durante el período de suceptibilidad a la enfermedad), fácilmente administrable (por ejemplo, mediante inmersión), polivalente (es decir, que proteja a los peces frenta a cepas virales antigénicamente distintas, aunque del mismo grupo, para poder ser utilizada en cualquier lugar del mundo que se necesite), económica (para que sea rentable), estable (que permanezca efectiva durante periodos de almacenamiento) y, por último, no debería interferir con las técnicas de diagnóstico utilizadas en los controles epidemiológicos.

Hasta hace pocos años las vacunas virales se dividían en dos grupos: inactivadas (las que presentan en su composición los virus inactivados o muertos) y atenuadas (las que contienen cepas virales virulentas atenuadas tras su pase en cultivo celular o cepas no virulentas). Ambos tipos de vacunas presentan algunos problemas: Las vacunas inactivadas suelen resultar muy caras y no confieren protección cuando se administran por inmersión, probablemente porque las partículas virales inactivadas no penetran, o al menos, no en suficiente cantidad en el pez; así que deben inyectarse, con lo que su uso queda limitado a peces de alto valor comercial. Las vacunas atenuadas presentan la ventaja de que pueden administrarse a través del agua y dado que los virus pueden replicar dentro del pez estimulan formas adicionales de inmunidad e interferencia; sin embargo, el riesgo de que los virus reviertan a un estado virulento o de una dispersión incontrolada en el medio ambiente hacen que el uso de estas vacunas sea controvertido. Por esta razón, un campo importante de investigación en la elaboración de vacunas contra enfermedades virales de peces es la manipulación genética. En la actualidad las investigaciones se centrán en las vacunas de ADN, una estrategia novedosa que se está utilizando con éxito para diversos patógenos de peces. Consiste en la introducción en el pez, habitualmente vía inyección intramuscular, de un plásmido que codifica una proteína inmunogénica del agente patógeno frente al cual se quiere conferir inmunidad; esta estrategia implica que la proteína viral se va a expresar dentro del pez y va a ser reconocida por el sistema inmune. La mayoría de los estudios realizados con vacunas ADN frente a virus en peces, se han realizado con rabdovirus, fundamentamente VHSV e IHNV (Anderson et al., 1996; Boudinot et al., 1998; Heppell et al., 1998), y en todos los casos se ha utilizado el gen de la glicoproteína, con diferentes tasas de éxito. También se ha utilizando la glicoproteína viral para desarrollar vacunas frente a otro rabdovirus como el SVCV (Kim et al., 2000). En el caso de IPNV, se ha estudiado la capacidad de 5 plásmidos distintos con partes o genes completos del segmento A de su genoma (Mikalsen et al., 2004); los resultados obtenidos indicaron que para conferir protección era necesario incluir la región codificante de la poliproteína completa. Un ensayo similar se realizó en pez gato, en el que se identificaron las regiones del herpesvirus de pez gato (IHV-1) capaces de conferir resistencia en una vacuna ADN (Nusbaum et al., 2002). En los ensayos realizados con nodavirus, una vacuna ADN en la que se incluye el gen que codifica para la proteína de la cápsideno es capaz de conferir protección (Sommerset et al., 2005).

C - Técnicas de diagnóstico

En la Figura 2 se esquematiza el protocolo a seguir para realizar un diagnóstico viral, y se citan las técnicas más empleadas en dicho diagnóstico. Estas técnicas se describirán a continuación más detalladamente.
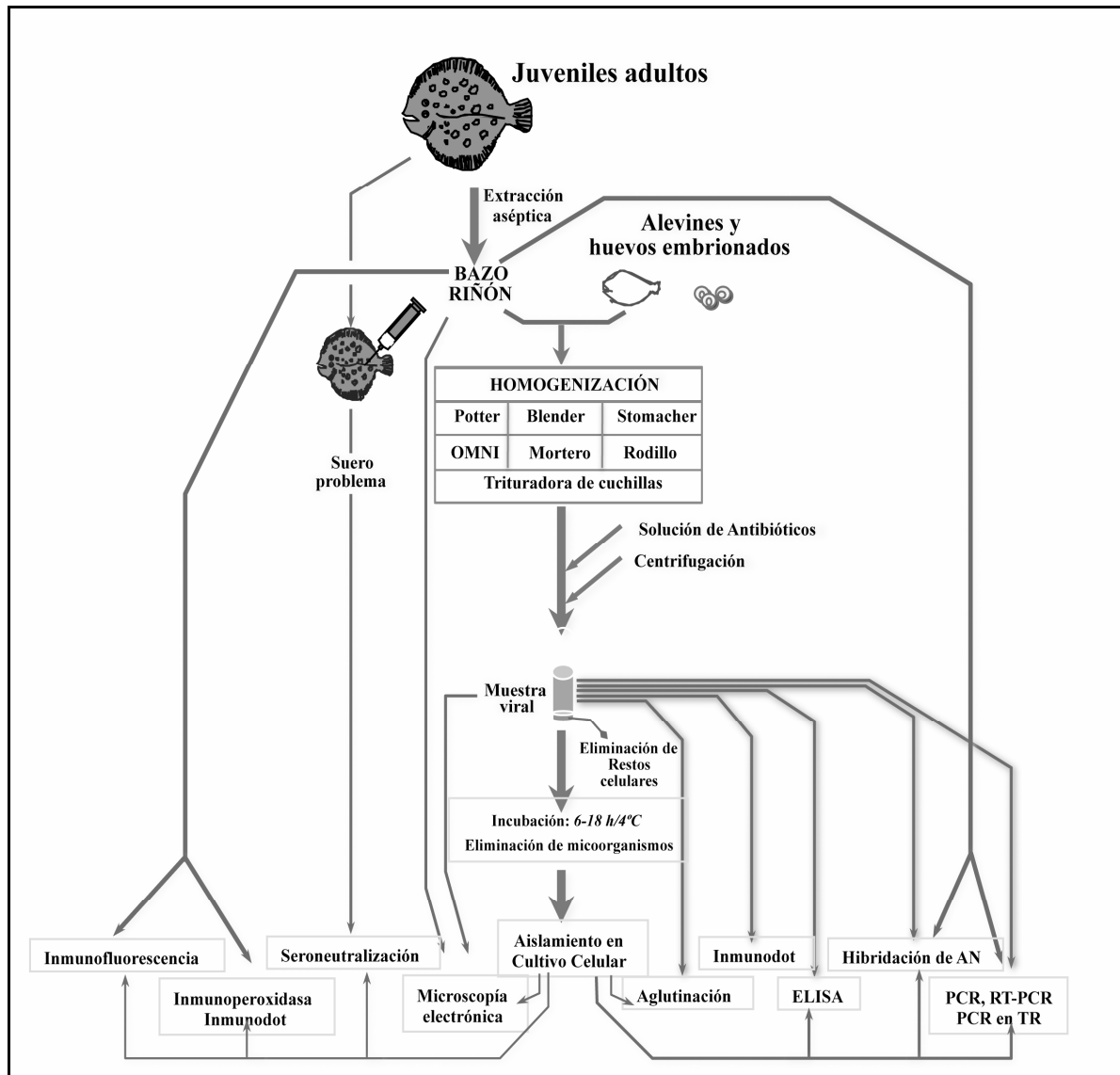
Figura 2. Clave de decisión para procesamiento y análisis de muestras.

Aislamiento en cultivo celular

La utilización de cultivos celulares es la técnica de diagnóstico más ampliamente utilizada, por su sencillez y por lo económico de su utilización, además de que no precisa de un aparataje especial para ser puesta en práctica, por lo que cualquier pequeño laboratorio de microbiología puede ser habilitado para la aplicación de esta técnica de diagnóstico.

Puesto que los virus son parásitos intracelulares obligados, para su cultivo se precisa de células vivas que puedan infectar y en las que puedan replicar; es decir, células susceptibles. En diagnóstico de virus de peces se utiliza una gran variedad de líneas celulares, pero las más ampliamente utilizadas son: CHSE-214 (Chinook salmo embryo), RTG-2 (rainbow trout gonad), FHM (fathead minnow), EPC (epithelioma papillosum cyprini), BB (brown bullhead) y BF-2 (bluegill fry). Estas células cubren un amplio rango de susceptibilidad viral; ésto implica que la mayor parte de los virus conocidos que afectan a animales acuáticos pueden ser aislados en alguna de estas líneas celulares.

Las líneas celulares crecen formando monocapas en las que todas las células están en contacto entre si. Cuando un virus infecta una de estas células se replica en su interior provocando una serie de alteraciones morfológicas que pueden finalizar con la lisis celular; al mismo tiempo el virus se va extendiendo a las células adyacentes, comenzando de nuevo el proceso, de tal forma que el conjunto de estas alteraciones recibe el nombre de efecto citopático (ECP) y es fácilmente visualizable bajo microscopía óptica. El tipo de efecto es característico de cada grupo viral y por lo tanto se puede utilizar como un primer paso hacia la identificación; sin embargo, dado que muchos grupos virales producen ECPs muy semejantes, se trata de una identificación aproximativa, nunca concluyente. Uno de los efectos más característicos es el producido por los aquareovirus, que consiste en la formación de sincitios; en este caso, el virus actúa produciendo la lisis de las membranas de células adyacentes, de tal forma que los núcleos se juntan en el centro; el aspecto al microscopio es el de una macrocélula plurinucleada.

El aislamiento en cultivo celular es una técnica suficientemente sensible para el diagnóstico y presenta la gran ventaja de su bajo coste, su principal desventaja es el tiempo necesario para poder confirmar la presencia viral en la muestra, como mínimo 15 días, porque en muchos casos estas 2 semanas pueden implicar la extensión de la epizootia por toda la piscifactoría. Por ello, en ocasiones es necesario utilizar otras técnicas más costosas pero que permiten un diagnóstico más rápido.

Microscopía electrónica

La microscopía electrónica (Figura 3) es una técnica tradicionalmente utilizada para el diagnóstico viral; incluso algunos científicos opinan que es esta técnica es más apropiada para el diagnóstico que el aislamiento en cultivo celular, dado que algunos de los virus de peces que se conocen en la actualidad no han podido ser aislados en líneas celulares. La visualización de las muestras mediante microscopía electrónica debe ser aplicada al menos en aquellos casos en que no se haya detectado presencia viral en cultivo celular. Sin embargo, también representa una gran ayuda cuando se ha conseguido

aislar el virus en líneas celulares, porque el conocimiento de la morfología y tamaño de las partículas virales es una de las primeras características necesarias para la identificación viral.
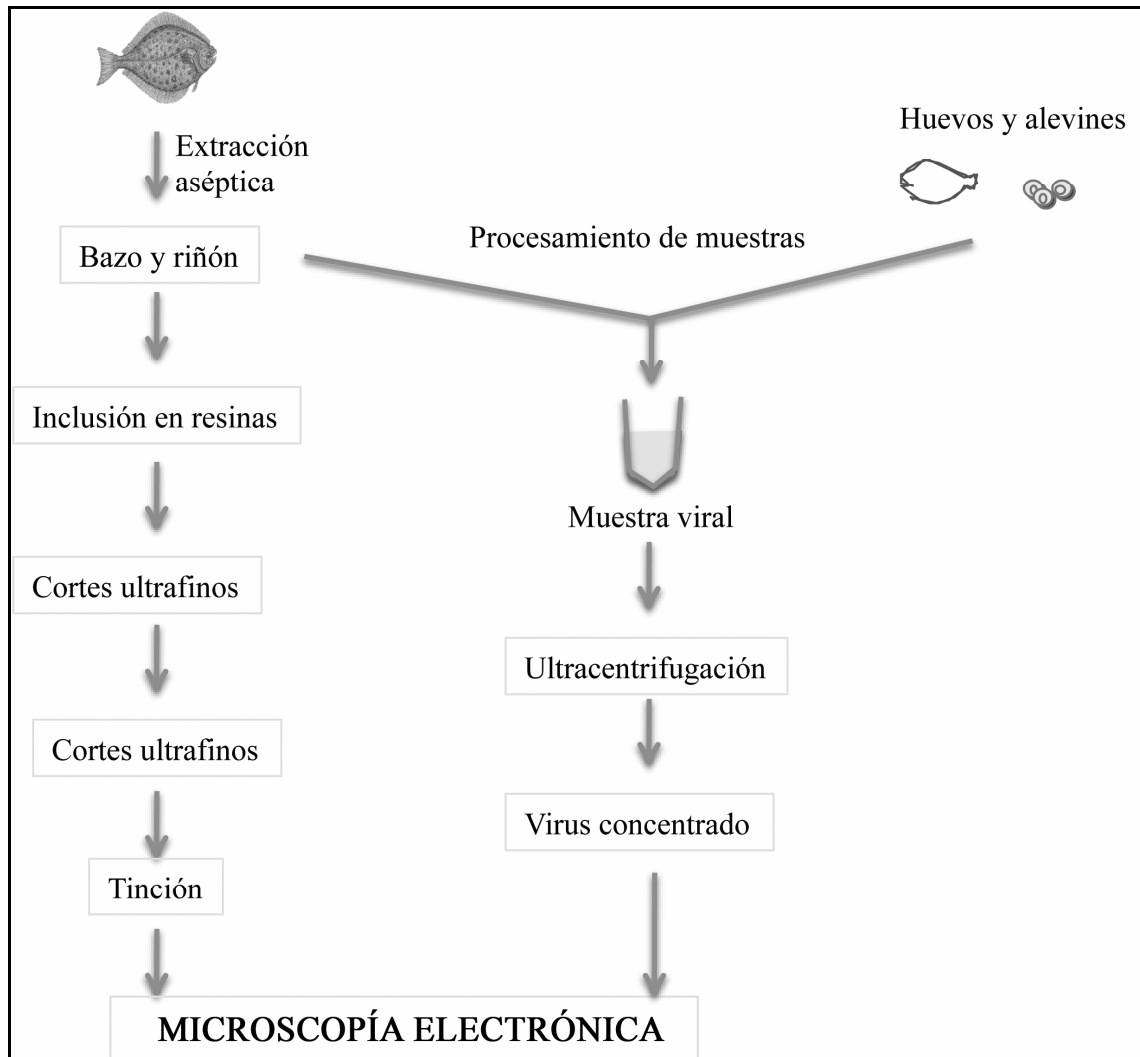
Figura 3. Uso de microscopía electrónica para diagnóstico.

Técnicas serológicas

a) *Seroneutralización*

Las proteínas que los virus usan para adsorberse a las células que van a infectar son a su vez proteínas antigénicas; un anticuerpo específico se

unirá a estas proteínas de adsorción o antirreceptores, impidiendo la unión del virus a la célula, con lo cual el virus no podrá replicar en la célula y no se desarrollará ECP en cultivo celular. Éste es precisamente el fundamento de la técnica de seroneutralización, que se aplica fundamentalmente para la identificación de virus aislados en cultivo celular, aunque una variante de esta técnica se aplica a la detección de anticuerpos en el suero de peces infectados.

En la modalidad empleada para la identificación, el virus aislado en cultivo celular se somete a tratamiento con diferentes antisueros contra virus conocidos, de tal modo que si alguno de estos antisueros neutraliza al virus habremos identificado al aislado. En la modalidad utilizada para diagnóstico, el suero obtenido a partir de peces infectados se utiliza contra distintos virus conocidos, si alguno es inactivado por el suero del pez sabremos que se trata de una infección viral y al mismo tiempo conoceremos el tipo de virus.

b) *Aglutinación*

Se trata de una técnica sencilla y barata, pero tiene el inconveniente de que presenta un elevado número de falsos positivos, aunque tiene la ventaja de que se puede aplicar directamente a los tejidos supuestamente infectados. Para ello, el tejido se homogeniza, se centrifuga; el sobrenadante se mezcla con una gota de una suspensión de *Staphylococcus aureus* ligado a anticuerpos especificos frente a un virus conocido y se observa la aglutinación directamente en un portaobtejos.

c) *Inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa*

La técnica de inmunofluorescencia se puede utilizar para la detección de virus tanto en cultivo celular como en tejido de peces. Como su nombre indica, esta técnica se basa en la utilización de un antisuero específico marcado con isotiocianato de fluoresceina; este antisuero se aplica sobre células infectadas, de modo que si la infección está provocada por un virus homólogo, las células quedarán teñidas con este marcador fluorescente; bajo luz ultravioleta, la fluoresceína emite luz visible, de modo que las células infectadas se visualizarán con una luz verdosa sobre un fondo obscuro. Una desventaja de este método es que en caso de utilizarse con tejidos, estos deben ser frescos o recientemente congelados, pero el principal inconveniente es la autofluorescencia de los tejidos del pez y las reacciones cruzadas que se producen, puesto que los antisueros que se utilizan son policlonales; desfortunadamente, aún no se ha confirmado si el uso de anticuerpos monoclonales incrementa la sensibilidad de esta técnica (Arnzen et al., 1991).

La técnica de inmunoperoxidasa, de realización muy semejante a la anterior, presenta la ventaja de que no necesita microscopio de fluorescencia y que las muestras teñidas se pueden conservar durante largos periodos de tiempo. Sin embargo, la necesidad de eliminar la peroxidasa endógena de los tejido del pez añade un paso más a esta técnica.

d) *ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) e inmunodot*

El ELISA, o ensayo inmunoenzimático, se utiliza tanto para diagnóstico como para identificación y goza de una gran popularidad en la actualidad por su rapidez, especificidad y sensibilidad. (Figura 4). El virus se adsorbe en el fondo de los pocillos de una placa de poliestireno (placa de microtitulación); a continuación se añaden antisueros contra virus conocidos, si alguno de estos antisueros es homólogo del virus problema los anticuerpos se unirán a los antígenos virales. En la variante de ELISA directo, estos anticuerpos están ligados a un enzima (fosfatasa alcalina o peroxidasa), de tal forma que al añadir el sustrato específico de este enzima se produce una reacción que desarrolla color. Así como para virus de homeotermos se comercializan antisueros contra distintos virus ligados a un enzima (conjugado) en el caso de virus de peces estos conjugados deben obtenerse en laboratorio, proceso muy laborioso si se tiene en cuenta que para utilizar en diagnóstico se necesita una batería de conjugados. Por ello se utiliza con más frecuencia la modalidad de ELISA indirecto, en el cual el antisuero específico no está marcado; tras el antisuero se añade una anti-inmunoglobulina conjugada con el enzima, y tras añadir el sustrato el desarrollo de color nos indicará que virus y antisuero son homólogos.

La técnica de inmunodot tiene el mismo fundamento y sensibilidad que el ELISA, aunque presenta algunas diferencias; así, el virus se liga a una membrana de nitrocelulosa, en lugar de en una placa plástico; otra diferencia es que no se necesita un aparataje específico para detectar el desarrollo de color, lo que abarata los costes (Hsu et al., 1989).
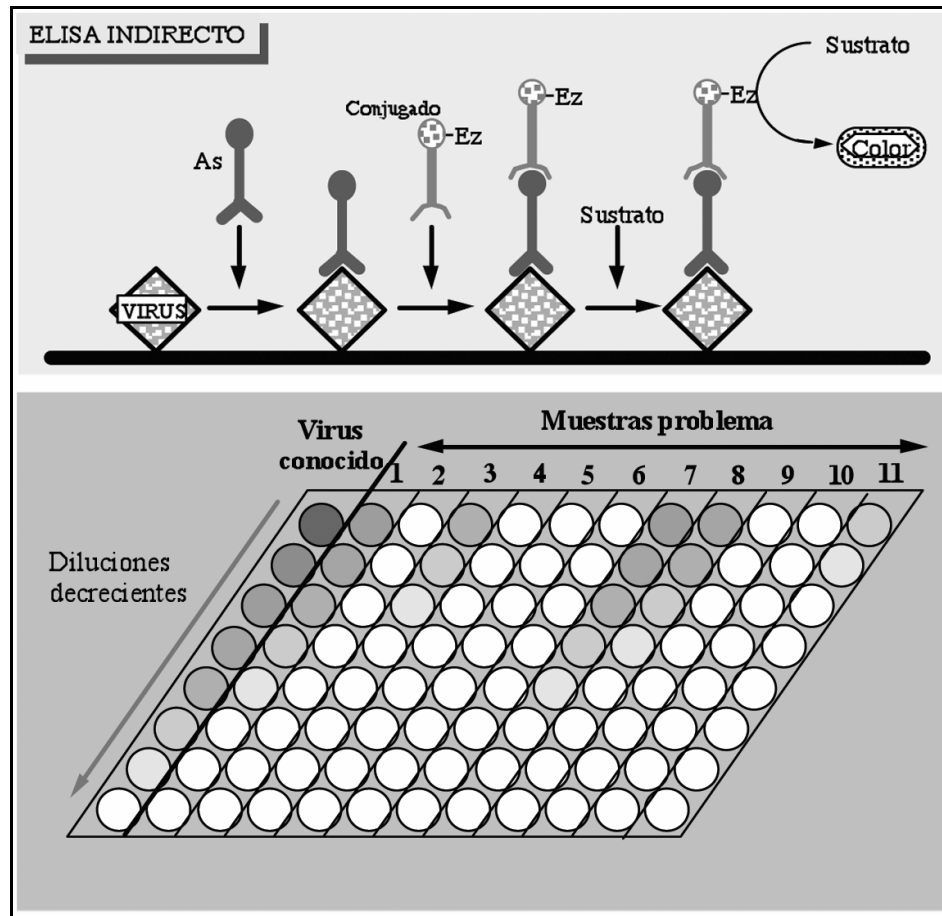
Figura 4. ELISA: base teórico-práctica.

Técnicas moleculares

a) *Hibridación de ácidos nucleicos*

Para el diagnóstico mediante hibridación las muestras de tejidos infectados o de virus aislados en cultivo celular se someten a un proceso de extracción de ácido nucleico total, que incluirá el ácido nucleico viral (Figura 5). Estas muestras de ácido nucleico se desnaturalizan para separar las cadenas y se fijan a una membrana de nylon; seguidamente se añade una sonda contra un virus conocido (DNA de un virus específico, marcado con isótopos radiactivos, o con marcaje no radiactivo), previamente desnaturalizada, de tal forma que el ácido nucleico de la sonda hibridará con aquellas muestras correspondientes a un virus homólogo. Tras un tiempo de incubación se expone la membrana con una película de rayos X (si la sonda es radiactiva), o se somete a un proceso de revelado específico (en el caso de sondas no radiactivas); finalmente se visualizarán puntos negros o de color

en los lugares correspondientes a las muestras con las que la sonda ha hibridado. Esta técnica tiene una gran sensibilidad permitiendo la detección de 10^2 a 10^3 virus por gramo de pez. Nuestro equipo ha utilizado esta técnica para el diagnóstico de virus como IPNV (Cutrín et al., 2005) y VHSV (López-Vázquez et al., 2006).
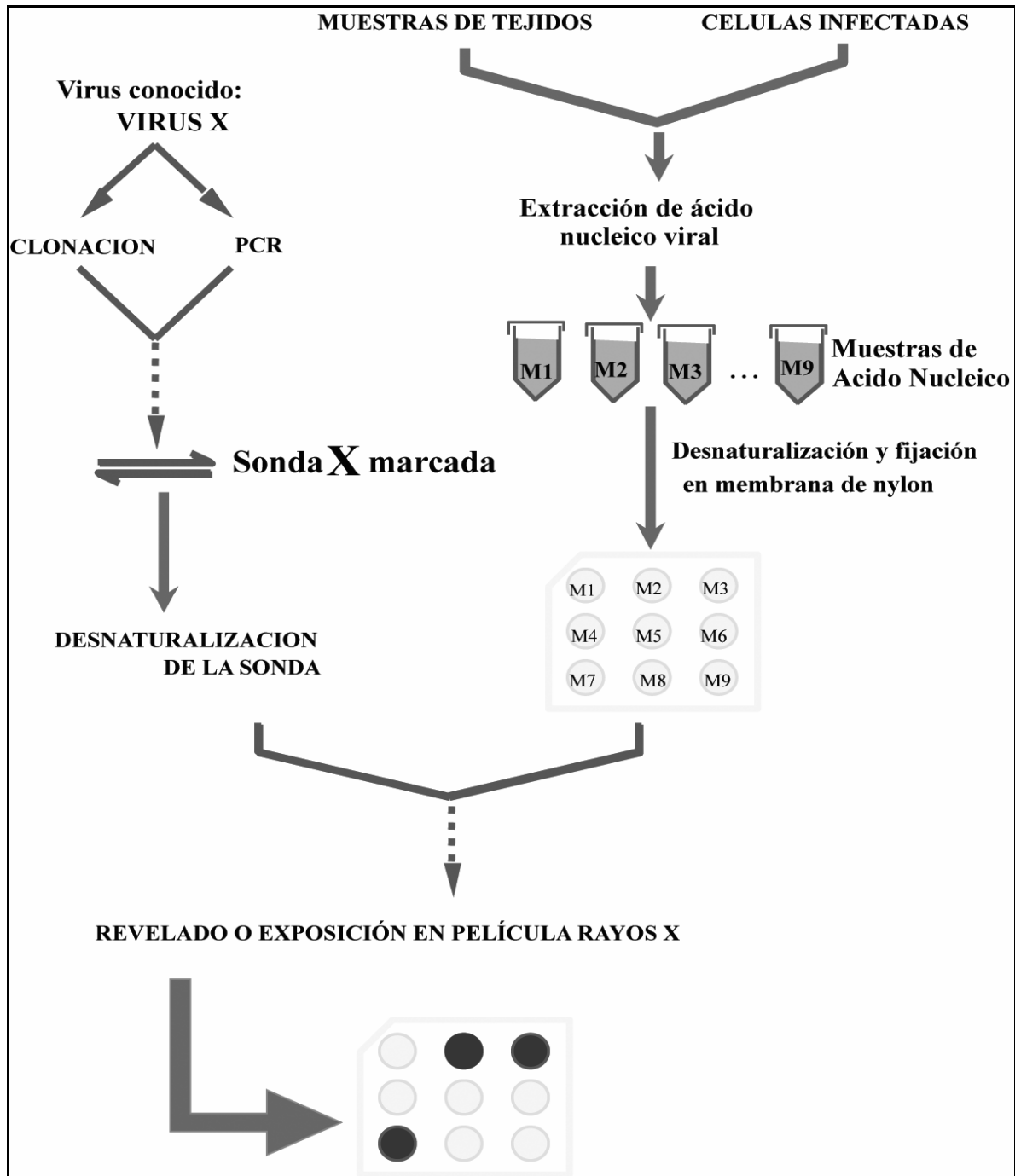
Figura 5. Procedimiento de diagnóstico mediante hibridación de ácidos nucleicos.

b) *PCR (reacción en cadena de la polimerasa*)

La técnica de PCR (Figura 6), es un método de diagnóstico de alta sensibilidad y especificidad. Ampliamente utilizado en clínica, su uso está poco extendido en acuicultura debido principalmente a su alto coste. De todas formas las grandes posibilidades que presenta esta técnica y el hecho de que en la actualidad haya algunos grupos de investigación tratando de optimizarla para su utilización con virus de animales acuáticos, hacen esperar que en un futuro no muy lejano se abaratarán los costes.

El primer paso imprescindible para poder utilizar la técnica de PCR para el diagnóstico es el conocimiento de la secuencia de los genomas de virus específicos. En la actualidad se conoce la secuencia genómica de numerosos virus de peces como IPNV, IHNV o el VHSV; el conocimiento de estas secuencias ha permitido elegir parejas de “primers” o “cebadores” específicas para los genomas de cada virus.

Para el diagnóstico, la muestra viral obtenida a partir de tejidos de pez o de cultivos celulares infectados se somete a PCR utilizando una pareja de cebadores específica para un determinado virus. Para ello, se prepara una mezcla de reacción que contenga el ácido nucleico extraído de esa muestra viral, una mezcla de los cuatro nucleótidos básicos, la Taq-polimerasa y la pareja de “cebadores” específicos para este virus, y esta mezcla de reacción se somete a una serie de ciclos de desnaturalización-polimerización. Al comienzo de cada ciclo el ácido nucleico se desnaturaliza a 90°C durante 1 minuto y a continuación se reduce la temperatura para permitir la hibridación de los cebadores a las cadenas de DNA patrón y comenzar la polimerización a temperaturas de alrededor. A lo largo de los ciclos se va multiplicando el número de copias del fragmento de DNA limitado por los dos cebadores, de tal forma que al final de los ciclos se obtiene, a partir de tan sólo una molécula patrón, del orden de 10^{10} fragmentos pequeños de DNA, cantidad fácilmente detectable mediante electroforesis en geles de agarosa. No se obtendrá producto de PCR si en la muestra a analizar hay un virus distinto a correspondiente a la sonda empleada, y siempre se sintetizarán fragmentos del mismo peso molecular cuando se trate del virus homólogo.

Una variante de esta técnica es la llamada "multiplex-PCR", metodología según la cual es posible la detección simultánea de varios genes y/o organismos, utilizando para ello más de una pareja de cebadores.

Además en muchas ocasiones, con el objeto de confirmar la especificidad de la amplificación y aumentar la sensibilidad, se recurre a una segunda amplificación con unos cebadores internos, lo que se conoce como nested-PCR.

Nuestro equipo utiliza rutinariamente la técnicas basadas en PCR (PCR y nested PCR) para el diagnóstico de numerosos virus de peces y hemos validado estos métodos (comprobando su limite de detección, y su reproducibilidad y repetitividad entre otros muchos parámetros), para el diagnóstico de VHSV (López-Vázquez et al., 2006) y nodavirus (Olveira et al., 2008). Además, el nuestro ha sido el primer laboratorio de patología de peces que ha aplicado esta tecnología a muestras de sangre lo que permite una detección incruenta, muy importante cuando se trata de reproductores o de otros peces con alto valor comercial o faunístico (Cutrín et al., 2005; López-Vázquez et al., 2006; Olveira et al., 2008).

c) PCR en tiempo real (rt-PCR)

La PCR en tiempo real utiliza el mismo principio que la PCR pero permite obtener los datos en menor tiempo gracias a la utilización de unos marcadores fluorescentes, de manera que la señal se incrementa de forma proporcional al producto de amplificación. Los marcadores son de dos tipos: agentes intercalantes (el más empleado es el SYBR Green I) y sondas específicas (que están marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor). Las sondas más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también TaqMan, las sondas *molecular beacons* y las sondas FRET. Esta técnica, aunque novedosa, ya se está utilizando para el diagnóstico de diferentes virus de peces como ISAV, VHSV, PDV o Iridovirus (Munir & Kibenge, 2004; Chico et al., 2006; Hodneland & Edresen, 2005; Wang et al., 2006).

d) Chips de DNA, micro y macroarrays

Una colección (array) de DNA consiste en un gran número de moléculas fijadas sobre un sustrato sólido de forma que formen una matriz de secuencias en dos dimensiones. Estos fragmentos de material genético pueden ser secuencias cortas (oligonucleótidos), de mayor tamaño (cDNA), o bien productos de PCR. A estos fragmentos de una sola hebra inmovilizados en el soporte se les denomina sondas. Los ácidos nucleicos procedentes de las muestras a analizar se marcan por diversos métodos (enzimáticos, fluorescentes y otros) y se incuban sobre el panel de sondas permitiendo la hibridación de secuencias homólogas y, por lo tanto, la identificación del patógeno. El diagnóstico de enfermedades de peces se está dirigiendo hacia la tecnología de macroarrays basados en PCR en tiempo real en placas de 96 o 384 pocillos, lo que permite incluir en muy poco espacio gran número de ensayos de diagnóstico. Además en cada *dot* se pueden incluir hasta 4 sondas distintas, con distintos marcadores que emiten longitudes de onda diferentes y discernibles mediante tecnología láser, de modo que se incrementa aún más el número de ensayos realizados simultáneamente sobre una misma muestra problema.

Esta técnica está muy avanzada en clínica humana y genómica y es la gran apuesta de futuro para el diagnóstico de enfermedades de peces, pero probablemente se necesite al menos una década para poder considerarla como una técnica de rutina en acuicultura.

Ciclo	Templ	Interm	Fragm
1	2	2	0
2	2	4	2
3	2	6	8
4	2	8	22
5	2	10	52
6	2	12	114
7	2	14	240
8	2	16	494
9	2	18	1004
35	2	70	$6{,}9 \times 10^{10}$
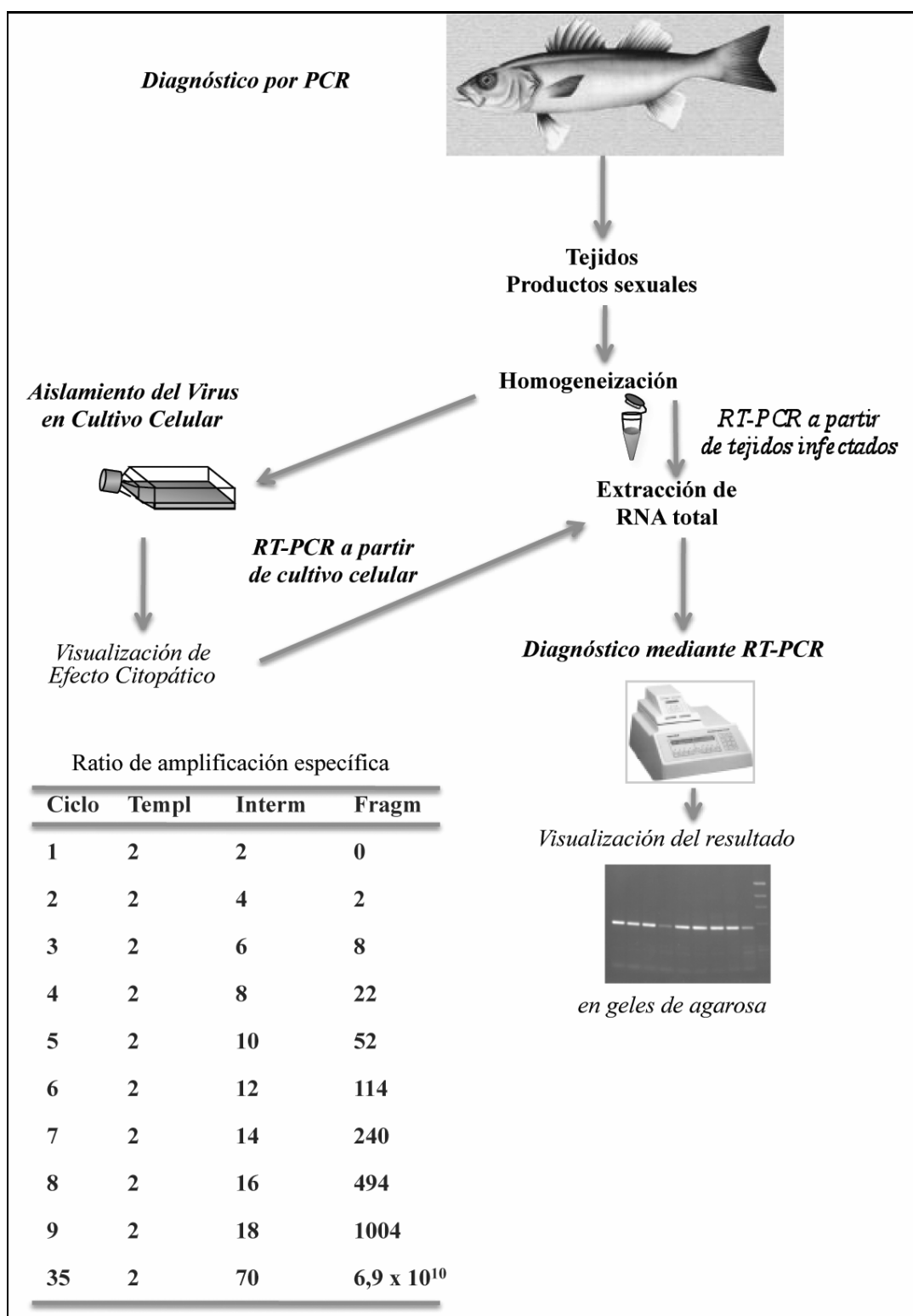
Figura 6. Procedimiento de diagnóstico mediante reacción en cadena de la polimersa (PCR).

Comentario final

En la actualidad no existe ningún quimioterápico efectivo en el tratamiento de las enfermedades virales de peces, si bien algunos compuestos han dado resultados esperanzadores, al menos in vitro, como es el caso del virazol para el tratamiento de IPN o de IHN. Otros autores han empleado diversos métodos de tratamiento, como el empleo de polivinilpirrolidona (PVP), ioduro de PVP y otros ioduros, o virazol (1-D-ribofluoranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide); sin embargo, la efectividad de estos productos fue en todo caso limitada, por lo que su utilización nunca se hizo efectiva (Economon, 1973; Migus & Dobos, 1980; Savan & Dobos, 1980).

Ultimamente muchos equipos están trabajando en la búsqueda de bacterias marinas productoras de sustancias con actividad antiviral, con la esperanza de que dichas sustancias sean de suficiente eficacia, además de obtención suficientemente económica, para rentabilizar su empleo en acuicultura.

Referencias

AHNE, W. 1985. Virusinfektionen bei fischen: Atiologie, diagnose und bekä mpfung. *Zbl. Vet. Med. B.*, 32:237-264.

AHNE, W.; NEGELE, R. D. 1985. Studies on the transmission of infectious pancreatic necrosis virus via eyed eggs ands sexual products of selmonid fish. In: ELLIS, A. E. (Ed.). *Fish and Shellfish Pathology*. London: Academic Press, p. 261-269.

AHNE, W.; ANDERS, K.; HOLDER, M.; YOSHIMIZU, M. 1990. Isolation of picorna-like particles from the European smelt (*Osmerus eperlano*). *J. Fish Dis.*, 13:167-168.

ANDERSON, E. D.; MOURICH, D. V.; FAHRENKRUG, S. C.; LAPATRA, S.; SHEPHERD, J.; LEONG, J. A. 1996. Genetic immunization of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol.Mar. Biol. Biotechnol.*, 5:114-122.

ARNZEN, J. M.; RISTOW, S. S.; HESSON, C. P.; LIENTZ, J. 1991. Rapid fluorescent antibody tests for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) utilizing monoclonal antibodies to the nucleoprotein and glycoprotein. *J. Aquat. Health,* 3:109-113.

BALL, H. J.; MUNRO, A. L. S.; ELLIS, A. E.; ELSON, K. G. R.; HODGKISS, W.; MCFARLANE, I. S. 1971. Infectious pancreatic necrosis in ranbow trout in Scotland. *Nature*, 234:417-418.

BASURCO, B.; MARCOTEGUI, M. A.; RUEDA, A.; TIANA, A.; CASTELLANOS, A.; TARAZONA, J. V.; MUÑOZ, M. J.; COLL, J. M. 1990. First report of lymphocystis disease in *Spaurus aurata* (Linnaeus) in Spain. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.,* 10:71-73.

BESSE, P.; DE KINKELIN, P. 1965. Sur l'existence en France de la nécrose pancréatique de la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*). *Bull. Acad. Vet.*, 38:185-190.

BLAKE, S. L.; MA, J.-Y.; CAPORALE, D. A.; JAIRATH, S.; NICHOLSON, B. L. 2001. Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced

amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Dis. Aquat. Org.*, 45:89–102.

BOONYARATPALIN, S.; SUPAMATTAYA, K.; KASORNCHANDRA, J.; HOFFMANN, R. W.; 1996. Picorna-like virus associated with mortality and a spongious encephalopathy in grouper *Epinephelus malabaricus*. *Dis. Aquat. Org*., 26:75-80.

BOOTLAND, L. M.; LEONG, J. C. 1999. Infectious haematopoietic necrosis virus. In: WOO, P. T. K.; BRUNO, D. W. (Ed.). Fish diseases and disorders, Vol 3. Viral, bacterial and fungal infections. Oxon: CABI Publishing, p. 57-121.

BOUCHARD, D. A.; BROCKWAY, K.; GIRAY, C.; KELEHER, W.; MERRIL, P. L. 2001. First report of infectious salmon anemia (ISA) in the United States. *Bull Eur Ass Fish Pathol.*, 21:86-88.

BOUDINOT, P.; BLANCO, M.; KINKELIN, P.; BENMANSOUR, A. 1998. Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout. *Virology*, 249:297-306.

BRADLEY, T.; NEWCOMER, C. E.; MAXWELL, K. O. 1988. Epitheliocystis associated with massive mortalities of cultured lake trout, *Salvelinus namaycush. Dis. Aquat. Org.,* 4:9-17.

BRAGG, R. R.; COMBRINK, M. E. 1987. Isolation and identification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus from rainbow trout in South Africa. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*., 7:118-120.

CEPEDA, C.; RIVAS, C.; LAMAS, J.; LEDO, A.; DOPAZO, C. P.; TORANZO, A. E. 1993. Patogenicidad de un nuevo agente viral (Paramyxovirus) aislado de rodaballo. In: CONG. NAC. ACUIC. ISLA DE AROSA, 4., 1993. *Actas...* [S.l.: s.n.], p. 651-655.

CHICO, V.; GOMEZ, N.; ESTEPA, A.; PÉREZ, L. 2006. Rapid detection and quantitation of viral hemorrhagic septicemia virus in experimentally challenged rainbow trout by real-time RT-PCR. *J.Virol. Meth*., 132:154-159.

CHRISTIE, K. E.; HÅVARSTAIN, L. S.; DJUPVIK, H. O.; NESS, S.; ENDRESEN, C. 1988. Characterization of a new serotype of infectious pancreatic necrosis virus isolated from Atlantic salmon. *Arch. Virol.,* 103:167-177.

COMPS, M.; PEPIN, J. F.; BONAMI, J. R. 1994. Purification and characterization of two fish encephalitis virus (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture,* 123:1-10.

CRANE, M.; HARDY-SMITH, P.; WILLIAMS, L. M.; HYATT, A. D.; EATON, L. M.; GOULD, A.; HANDLINGER, J.; KATTENBELT, J.; GUDKOVS, N. 2000. First isolation of an aquatic birnavirus from farmed and wild fish species in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, 43:1-14.

CUTRÍN, J. M.; OLVEIRA, J. G.; BARJA, J. L.; DOPAZO, C. P. 2000. Diversity of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated from fish, shellfish and reservoirs in Northwestern Spain. *Appl Environ. Microbiol*., 66:839-843.

CUTRÍN, J. M.; LÓPEZ-VÁZQUEZ, C.; OLVEIRA, J. G.; CASTRO, S.; DOPAZO, C. P.; BANDÍN, I. 2005. Isolation in cell culture and detection by RT-PCR of IPNV-like virus from leucocytes of carrier turbot (*Scophthalmus maximus*). *J. Fish Dis.*, 28:713-722.

CUTRÍN, J. M.; BANDÍN, I.; BARJA, J. L.; NICHOLSON, B. L.; DOPAZO, C. P. 2004. Restriction fragment length polymorphisms (RFLP`s) and sequence analysis: an approach for genotyping IPNV reference strains and other aquatic birnaviruses isolated from Northwestern Spain. *Appl. Environ. Microbiol*., 70:1059-1067.

CUTRÍN, J. M.; DOPAZO, C. P.; THIÉRY, R.; LEAO, P.; OLVEIRA, J. G.; BARJA, J. L.; BANDÍN, I. 2007. Emergence of pathogenic betanodaviruses belonging to the SJNNV genogroup in farmed fish species from the Iberian Peninsula. *J. Fish. Dis*., 30:225-232.

DANNEVIG, B. H.; THORUD, K. E. 1999. Other viral diseases and agents of cold-water fish: infectious salmon anaemia, Páncreas deisease and Viral erythrocytic necrosis. In: WOO, P. T. K.; BRUNO, D. W. (Ed.). *Fish diseases and fish disorders*. Bristol: CABI Publishing, p. 149-175.

DARLINGTON, R. W.; TRAFFORD, R.; WOLF, K. 1972. Fish rhabdoviruses: morphology and ultrastructure of North American salmonid isolates. *Arch. Gesamte Virusforsch,* 39:257-264.

DAVIDSE, A.; HAENEN, O. L .M.; DIJKSTRA, S. G.; VAN NIEUWSTADT, A. P.; VAN DER VORST, T. J. K.; WAGENAAR, F.; WELLENBERG, G. J. 1999. First isolation of herpesvirus of eel (*Herpes-virus anguillae*) in diseased European eel (*Anguilla anguilla* L.) in Europe. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.,* 19:137-141.

DE KINKELIN, P.; DORSON, P.; HATTENBERGER-BAUDOUY, A. M. 1982. Interferon synthesis in trout and carp after viral infection. *Dev. Comp. Immunol., Suppl*., 2:167-174.

DE KINKELIN, P.; SCHERRER, R. 1970. Le virus d'Egtved. I. Stabilite, developpment et structure du virus de la souche danoise F1. *Ann. Rech. Vet*., 1:17-30.

DOBOS, P.; HALLETT, R.; KELLS, D. T. C.; SORENSEN, O.; ROWE, D. 1977. Biophysical studies of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol*., 22:150-159.

DOBOS, P.; HILL, B. J.; HALLETT, R.; KELLS, D. T. C.; BECHT, H.; TENINGES, D. 1979. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J. Virol*., 32:593-605.

DOPAZO, C. P. 1991. *Caracterizaión de birnavirus y rotavirus de peces: Propiedades biológicas, serológicas y moleculares*. Tesis (Doctoral) – *Universidad de Santiago de Compostela, Espña*.

DOPAZO, C. P.; BARJA, J. L. 2002. Diagnosis and identification of IPNV in salmonids by molecular methods. In: CUNNINGAN, C. (Ed.). *Molecular diagnosis of salminid diseases*. Holanda: Kluwer Acad. Publ, p. 23-48.

DOPAZO, C. P.; BANDÍN, I.; RIVAS, C.; CEPEDA, C.; BARJA, J. L. 1996a. Antigenic differences among aquareoviruses correlate with previously established genegroups. *Dis. Aquat. Org*., 26:159-162.

DOPAZO, C. P.; RIVAS, C.; BANDÍN, I.; NOYA, M.; CUTRÍN, M.; BARJA, J. L. 1996b. Isolation of an aquareovirus from rainbow trout in N.W. Spain. *FHS News Lett*., 24: 10-11.

DUNCAN, I. B. 1978. Evidence for an oncovirus in swimbladder fibrosarcoma of Atlantic salmon, *Salmo salar*, L. *J. Fish Dis,* 1:127-131.

ECONOMON, P. P. 1973. Polyvinylpirrolidone-iodine as a control for infectious pancreatic necrosis (IPN) of brook trout. In: DILL, W. A. (Ed.). Symp.

Major Communic. Fish Dis. Eur., & Control EIFAC (Eur. Inland Fish. Advis. Comm.). [S.l.: s.n.], 17:59-66. (Tech. Paper)

FIJAN, N. 1968. Progress report on acute mortality of channel catfish fingerlings caused by a virus. *Bull. Off. Inter. Epizoot,* 69:1167-1168.

FIJAN, N. 1974. Zarazna nekroza gusterace pastrova: prvi nabaz virusa u. Zugoslaviji. *Vet. Arch*., 44:187-192.

FIJAN, N. 1988. Vaccination against spring viremia of carp. In: ELLIS, A. E. (Ed.). *Fish Vaccination*. London: Academic Press, p. 204-215.

FRANCKI, R. I. B.; FAUQUET, C. M.; KNUDSON, D. L.; BROWN, F. (Ed.). 1991. *Classification and Nomenclature of Viruses*. New York: Springer-Verlag Wien. (Arch. Virol.Suppl., 2). First Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.

FRERICHS, G. N.; HILL, B. J.; WAY, K. 1989. Ulcerative disease rhabdovirus: Cell-line susceptibility and serological comparison with other fish rhabdoviruses. *J. Fish Dis*., 12:51-56.

GHITTINO, P. 1972. Malattie esotiche dei pesci che minacciano troticoltura e carpicolutra italiane. *Riv. Ital. Piscicol. Ittiopatol*., 7:53-62.

GLAZEBROOK, J. S.; HEASMANN, M. P.; DE BEER, S. W. 1990. Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *J. Fish Dis.,* 13:245-249.

HAH, Y.; HONG, S.; KIM, M.; FRYER, J. L.; WINTON, J. R. 1984. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from glodfish (*Carassius auratus*) and chum salmon (*Oncorrhynchus keta*) in Korea. *Korean J. Microbiol.,* 22:85-90.

HARSTEIN, T.; KROGSSUD, J. 1976. Infectious pancreatic necrosis first isolation of virus from fish in Norway. *Acta Vet. Scand*., 17:109-111.

HEDRICK, R. P.; FRYER, J. L.; CHEN, S. N.; KOO, G. H. 1983. Characteristics of four birnaviruses isolated from fish in Taiwan. *Fish Pathol*., 18:91-97.

HEDRICK, R. P.; YUN, S.; WINFIELD, W. H. 1991. A small RNA virus isolated from salmonid fishes in California. *Can. J. Fish Aquat. Sci*., 48:99-104.

HEDRICK, R. P.; GILAD, O.; YUN, S. C.; MCDOWELL, T. S.; WALTZEK, T. B.; KELLEY, G. O.; ADIKSON, M. A. 2005. Initial isolation and characterization of a Herpes-like virus (KHV) from koi and common carp. *Bull. Fish Res. Agency*., Supl., 2:1-7.

HEPPELL, J.; LORENZEN, N.; ARMSTRONG, N. K.; WU, T.; LORENZEN, E.; EINER-JENSEN, K.; SCHORR, J.; DAVIS, H. L. 1998. Development of DNAvaccines for fish: vector design, intramuscularinjection and antigen expression using viralhaemorrhagic septicaemia virus genes asmodel. *Fish & Shellfish Immunol*., 8(4):271-286

HETRICK, F. M.; HEDRICK, R. P. 1993. New viruses described in finfish from1988-1992. *Ann. Rev. Fish Dis*., 3:197-207.

HILL, B. J. 1982. Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence. In: ROBERTS, R. J. (Ed.). *Microbial Diseases of Fish*. London: Acad. Press, p. 91-114.

HILL, B. J.; WAY, K. 1988. Proposed standardisation of the serological classification of aquatic birnavirus. *Int. Fish Health Conf*. Vancouver, Canadá, p. 151.

HODNELAND, K.; ENDRESEN, C. 2005. Sensitive and specific detection of Salmonid alphavirus using real-time PCR (TaqMan®). *J. Virol. Meth,* 131:184-192.

HSU, Y. L.; CHIANG, S. Y.; LIN, S. T.; WU, J. L. 1989. The specific detection of infectious pancratic necrosis virus in infected cells and fish by the immudot blot method. *J. Fish Dis*., 12:561-571.

ICES Council Meeting. 2003. Reporto f the working Group on pathology and diseases ofmarine organisms, Aberdeen, UK, 11-15 March 2003. ICES Council Meeting Documents no. 2003

IIDA, Y.; MASUMURA, K.; NAKAI, T.; SORIMACHI, M.; MATSUDA, H. 1989. A viral disease in larvae and juveniles of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Aquat. Anim. Health*., 1:7-12.

ILOZE, M.; ARNON, D.; KOTLER, M. 2005. Characterization of a novel virus causing a letal disease in carp and koi. *Microbiol Mol Biol Rev*. 70: 147-156.

JENSEN, M. H. 1965. Research on the virus of Egtved diseas. *Amm, N.Y. Acad. Sci.,* 126:422-426.

JOHNSTON, M. R. L. 1975. Distribution of Pirhemocyton Chatton and Blanc and other, possibly related, infections of poikilotherms. *J. Protozool.,* 22:529-535.

JØRGENSEN, P. E. V.; BRENGBALLE, F. 1969. Infectious pancreatic necrosis in rainbow trout (Salmo gairdneri) in Denmark. *Nord. Vet. Med*., 21:142-148.

JØRGENSEN, P. E. V.; KEHLET, N. P. 1971. Infectious pancreatic necrosis (IPN) viruses in Danish rainbow trout: their serological and pathogenic properties. *Nord. Vet. Med*., 23:568-575.

KELLY, D. C.; ROBERTSON, J. S. 1973. Icosahedral cytoplasmic deoxyriboviruses. *J. Gen. Virol*., 20:17-41.

KIBENGE, F. S. B.; GARATE, O. N.; JOHNSON, G.; ARRIAGADA, R.; KIBENGE, M. J. T.; WADOWSKA, D. 2001. Isolation and identification of infectious salmon anaemia virus (ISAV) from Coho salmon in Chile. *Dis Aquat Organ.*, 45:9-18.

KIM, C. H.; JOHNSON, M. C.; DRENNAN, J. D.; SIMON, B. E.; THOMANN, E.; LEONG, J. A. C. 2000. DNA vaccines encoding viral glycoproteinsinduce nonspecific immunity and Mx proteinsynthesis in fish. *J. Virol.*, 74:7048-7054.

KIMURA, T.; YOSHIMIZU, M.; TANAKA, M.; SANNOCHE, H. 1981. Studies on a new virus (OMV) from *Oncorhynchus masou* I. Characteríctics and pathogenicity. *Fish. Pathol.,* 15:143-147.

KOSKI, P.; HILL, B.; WAY, K.; NEUVONEN, E.; RINTAMAKI, A. 1992. A rhabdovirus isolated from brown trout, Salmo trutta lacustris (L.) with lesions in parenchymatous organs. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 12:177-180.

KUDO, S.; KUROSAWA, D.; KUNIMENI, I.; NOBUSAWA, K.; KOBAYASHI, S. 1973. electron microscopic observations of the pancreas and liver in the fingerling rainbow trout with symthoms of IPN. *Jpn. J. Ichthyol,* 20:163-177.

KVELLESTAD, A.; DANNEVIG, B. H.; FALK, K. 2003. Isolation and parcial characterization of a novel paramixovirus from the gills of diseased seawater-reared Atlantic salmon (Salmo salar L.). *J. Gen Virol*., 84: 2179-2189.

LANGDON, J. S.; HUMPHREY, J. D. 1987. Epizootic haematopoietic necrosis, a new viral disease in redfin perch, *Perca fluviatilis* L. in Australia. *J. Fish Dis.*, 10:298-299.

LEDO, A.; DOPAZO, C. P.; LUPIANI, B.; BARJA, J. L.; TORANZO, A. E. 1987. Incidencia del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en Galicia. *Cuad. Marisp. Publ. Téc.,* 12:645-650.

LEDO, A.; LUPIANI, B.; DOPAZO, C. P.; TORANZO, A. E.; BARJA, J. L. 1990. Fish Viral Infections in Northwest of Spain. *Microbiología* (SEM), 6:21-29.

LJUNGBERG, O.; JØRGENSEN, P. E. V. 1973. Infectious pancreatic necrosis (IPN) of salmonids in Swedish fish farms. In: DILL, W. A. (Ed.). Symposium on the major communicable fish diseases in Europe and their control. *Eur. Inland Fish. Advis. Comm*., 67-70.

LÓPEZ-VÁZQUEZ, C.; DOPAZO, C. P.; OLVEIRA, J. G.; BARJA, J. L.; BANDÍN, I. 2006. Development of a rapid, sensitive and non-lethal diagnostic assay for the detection of viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Virol. Meth.,* 133:167-174.

MACKELVIE, R. M.; ASTROB, H. 1969. Infectious pancreatic necrosis virus in young salmonids of the Canadian maritime provinces. *J. Fish. Res. Bd. Can*., 26:3259-3262.

MACMILLAN, J. R.; MULCAHY, D.; LANDOTL, M. 1980. Viral erythrocytic necrosis: some physiological consecuences of infection in chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *J. Fish. Res. Bd Can.,* 37:799-804.

MCALLISTER, P. E.; HERMAN, R. L. 1989. A chlamydia-like organism associated with high mortality in hatchery-reared lake trout (*Salvelinus namaycush*). *AFS-FHS News Lett*., 15:6.

MCALLISTER, P. E.; REYES, X. 1984. Infectious pancreatic necrosis virus: isolation from rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson, imported from Chile. *J. Fish Dis*, 7:319-322.

MCKNIGHT, I. J.; ROBERTS, R. J. 1976. The pahology of infectious pancreatic necrosis. I. The sequential hystopathology of the naturally occurring condition. *Br. Vet. J*., 132:76-85.

MCLOUGHLIN, M. F. 1997. The differential diagnosis of the major pancreatic disorders of salmonids, a diagnostic Challenger. Bull. Eur. Assoc. *Fish Pathol*., 17(6):205-208.

MCLOUGHLIN, M. F.; GRAHAM, D. A. 2007. Alphavirus infections in salmonids – A review. *J Fish Dis.*, 30:511-531.

MELLERGARD, S.; BLOCH, B. 1988. Herpesvirus-like particles in angelfish (*Pterophyllum altum*). *Dis. Aquat. Org*., 5:151-155.

M'GONIGLE, R. H. 1941. Acute catarrhal enteritis of salmonid fingerlings. *Trans. Am. Fish. Soc*, 70:297-303.

MIGUS, D. O.; DOBOS, P. 1980. Effect of ribavirin on the replication of infectios pancreatic necrosis virus in fish cell cultures. *J. Gen. Virol*., 47: 47-57.

MIKALSEN, A. B.; TORGERSEN, J.; ALESTROM, P.; HELLEMANN, A. L.; KOPPANG, E. O.; RIMSTAD, E. 2004. Protection of atlantic salmon Salmo salar against infectious pancreatic necrosis after DNA vaccination. *Dis. Aquat. Org.*, 60(1):11-20.

MJAALAND, S.; RIMSTAD, E.; CUNNINGHAM, C. O. 2002. Molecular diagnosis of infectious salmon anaemia. In: CUNNINGAN, C. (Ed.). *Molecular Diagnosis of Salminid Diseases*. Holanda: Kluwer Acad. Publ., p. 1-22.

MOORE, A. R.; LI, M. F.; MCMENEMY, M. 1988. Isolation of a picorna-like virus from smelt (*Osmerus mordax* Mitchell). *J. Fish Dis.*, 11:179-184.

MORI, K. I.; NAKAI, T.; NAGAHARA, M.; MUROGA, K.; MEKUCHI, T.; KANNO, T. 1991. A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of redspotted grouper. *Fish Pathol.*, 26:209-210.

MUNDAY, B.; KWANG, J.; MOODY, N. 2002. Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis.*, 25:127-142.

MUNDAY, B. L.; LANGDON, J. S.; HYATT, A.; HUMPHREY, J. D. 1991. Mass mortalities associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval and juvenile Barraundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Aquaculture,* 103:197-211.

MUNIR K.; KIBENGE, F. S. 2004. Detection of infectious salmon anaemia virus by real-time RT-PCR. J*. Virol. Meth.*, 117:37-47.

NEWBOUND, G. C.; KENT, M. L. 1991. Experimental interspecies transmission of plasmacytoid leukemia in salmonid fishes. *Dis. Aquat. Org.*, 10:159-166.

NOUGAYREDE, P.; DE KINKELIN, P.; CHILMANCZYK, S.; VUILLAUME, A. 1992. Isolation of a rhabdovirus from the pike-perch, *Stizostedion lucioperca* (L 1758). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 12:5-7.

NUSBAUM, K. E.; SMITH, B. F.; DEINNOCENTES, P.; BIRD, R. C. 2002. Protective immunity induced by DNA vaccination of channel catfish with early and late transcripts of the channel catfish herpesvirus (IHV-1). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 84(3-4):151-168.

OIE. 2000. *Manual of diagnostic tests for aquatic animals*. Paris: OIE.

OLVEIRA, J. G.; SOARES, F.; ENGROLA S.; DOPAZO, C. P.; BANDÍN I. 2008. Antemortem versus postmortem methods for detection of betanodavirus in Senegalese sole (Solea senegalensis). *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20:215-219.

PAPAS, T. S.; DAHLBERG, J. E.; SONSTEGARD, R. A. 1976. Type C virus in lymphosarcoma in northern pike (Esox lucius). *Nature* (London), 261: 506-508.

PLARRE, H.; DEVOLD, M.; SNOW, M.; NYLUND, A. 2005, Prevalence of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in wild salmonids in western Norway. *Dis Aquat Organ.*, 66:71-79.

PLUMB, J. A. 1977. Epizootiology of channel catfish virus disease. *Mar. Fish. Rev.*, 40:26-29.

RENAULT, T.; HAFFNER, P.; BAUDIN LAURENCIN, F.; BREUIL, G.; BONAMI, J. R. 1991. Mass mortalities in hatchery-reared sea bass (*Lates calcarifer*) larvae associated with the presence in the brain and retina of virus-like particles. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 11:68-73.

RENO, P. W.; NICHOLSON, B. L. 1981. Ultrastructure and prevalence of viral erythrocytic necrosis (VEN) virus in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. from the northern Atlantic Ocean. *J. Fish Dis.,* 4:361-370.

ROHOVEC, J. S.; AMANDI, A. 1981. Incidence of viran erythrocytic necrosis among hatchery reared salmonids of Oregon. *Fish. Pathol.*, 15: 135-141.

ROSS, K.; MCCARTHY, U.; HUNTLY, P. J.; WOOD, B. P.; STUART, D.; ROUGH, E. I.; SMAIL, D. A.; BRUNO, D. W. 1994. An outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in turbot (*Scophthalmus maximus*) in Scotland. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.,* 14:213-214.

SANO, T. 1971a. Studies on viral diseases of Japanese fishes. I. Infectious pancreatic necrosis of rainbow trout: First isolation from epizootics in Japan. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 37:495-498.

SANO, T. 1971b. Studies on viral diseases of japanese fishes. II. Infectious pancreatic necrosis of rainbow trout: pathogenicity of the isolants. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.,* 37:499-503.

SANO, T. 1976. Viral diseases of cultured fishes in Japan. *Fish Pathol.*, 10: 221-226.

SAVAN, M.; DOBOS, P. 1980. Effect of virazole on rainbow trout Salmo gairdneri Richardson fry infected with infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish. Dis.*, 3:437-440.

SCHLOTFELDT, H. J.; LIESS, B.; FROST, J. W. 1975. Erst isolierung und identifizierung derl virus der infektiosen pankreasnekrose. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.*, 88:109-111.

SKALL, H. F.; OLESEN, N. J.; MELLERGAARD, S. 2005. Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming-a review. *J. Fish Dis.,* 28:509-529.

SMAIL, D. A. 1982. Viral erythrocytic necrosis of fish: a review. *Proc. R. Soc. Edinburgh*, 81:169-175.

SMAIL, D. A. 1999. Viral haemorrhagic septicaemia. In: WOO, P. T. K.; BRUNO, D. W. (Ed.). Fish diseases and disorders" Vol 3: Viral, bacterial and fungal infections. Oxon: CAB International, p. 123-147.

SNOW, M.; SMAIL, D. A. 1999. Experimental susceptibility of turbot *Scophthalmus maximus* to viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from cultivated turbot. *Dis. Aquat Org.*, 38:163-168.

SOMMERSET, I.; SKERN, R.; BIERING, E.; BLEIE, H.; FIKSDAL, I. U.; GROVE, S.; NERLAND, A. H. 2005. Protection against Atlantic halibut nodavirus in turbot is induced by recombinant capsid protein vaccination but not following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol.*, 18(1):13-29.

SOUSA, J. A.; ROMALDE, J. L.; LEDO, A.; EIRAS, J. C.; BARJA, J. L.; TORANZO, A. E. 1996. Health status of two salmonid aquaculture facilities in North Portugal: characterization of the bacterial and viral pathogens causing notifiable diseases. *J Fish Dis.*, 19:83-89.

TODD, D.; MCNULTY, M. S. 1979. Biochemical studies with infectious bursal disease virus: Comparison of some of its properties with infectious pancreatic necrosis virus. *Arch. Virol.*, 60:265-277.

UENO, Y.; KITAO, T.; CHEN, S.; AOKI, T.; KOU, G. 1992. Characterization of a herpes-like virus isolated from cultured Japanese eels in Taiwan. *Fish Pathol.*, 27:7-17.

VILLOING, S.; CASTRIC, J.; JEFFROY, J.; LE VEN, A.; THIERY, R.; BREMONT, M. 2000. An RT-PCR-based method for the diagnosis of the sleeping disease virus in experimentally and naturally infected salmonids. *Dis. Aquat. Org.*, 40(1):19-27.

WANG, X.-W.; AO, J.-Q.; LI, Q.-C.; CHEN, X.-H. 2006. Quantitative detection of a marine fish iridovirus isolated from large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*, using a molecular beacon. *J. Virol. Meth.*, 133: 76-81.

WATANABE, K.; KARLSEN, M.; DEVOID, M.; ISDAL, E.; LITLABOE, A.; NYLUND, A. 2006. Virus-like particles associated with heart and skeletal muscle inflammation (HSMI). *Dis Aquat. Org.*, 70:183-192.

WATSON, S. W.; GUENTHER, R. W.; RUEKER, R. R. 1954. A virus disease of sockeye salmon: interim report. *U.S. Fish Wildl. Serv., Spec. Sci. Rep. Fish,* 138.

WILLIAMS, T. 1996. The iridoviruses. *Adv. Virus Res.*, 46:345-412.

WINTON, J. R.; EINER-JENSEN, K. 2002. Molecular diagosis of infectious hematopoietic necrosis virus and viral hemorrhagic septicemia virus. In: CUNNINGAN, C. (Ed.). *Molecular Diagnosis of Salminid Diseases*. Holanda: Kluwer Acad. Publ, p. 49-80.

WINTON, J. R.; LANNAN, C. N.; FRYER, J. L.; HEDRICK, R. P.; MEYERS, T. R.; PLUMB, J. A.; YAMAMOTO, T. 1987. Morphological and biochemical properties of four members of a novel group of reoviruses isolated from aquatic animals. *J. Gen. Virol*., 68:353-364.

WOLF, K. 1984. Diseases caused by microorganisms. Agents: Virales. In: KINNE, O. (Ed.). *Diseases of Marine Animals Vol IV (Pisces)*. Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland, p. 17-47.

WOLF, K. 1988. *Fish viruses and fish viral diseases*. Ithaka, USA: Cornell Univ. Press.

WOLF, K.; BULLOCK, G. L.; DIMBAR, C. E.; QUIMBY, M. C. 1968. Viral diseases of freshwater fishes and other lower vertebrates: comparative studies on IPN virus. *Progs. Sport. Fish. Res*., 77:138-140.

WOLF, K.; DARLINGTON, R. W.; TAYLOR, W. G.; WUYMBY, M. C.; NAGABAYASHI, T. 1978. *Herpesvirus salmonis*: Characterization of a new pathogen of rainbow trout. *J. Virol*., 27:659-666.

WOLF, K.; SCIESZCO, S. F.; DUNBAR, C. E. 1959. Infectious pancreatic necrosis, a virus-caused disease of fish. *Excerpta Med.*, 13(Sec 1):228.

WOLF, K.; SNIEZKO, S. F.; DUNBAR, C. E.; PYLE, E. 1960. Virus Nature of infectious pancreatic necrosis in trout. *Proc. Soc. Expert. Biol. Med*., 104:105-108.

WOLF, K.; TAYLOR, W. G. 1975. Salmonid viruses: A syncytium-forming agent from rainbow trout. *Fish Health News,* 4:3.

WOOD, E. M.; SNIESZCO, S. F.; YASUTAKE, W. T. 1955. Infectious pancreatic necrosis in brook trout. *Act. Pathol*., 60:26-28.

YAMAMOTO, T.; MACDONALD, R. D.; GILLESPIE, D. C.; KELLY, R. K. 1976. Viruses associated with lymphocystic disease and dermal sarcoma of walleye (*Stozostedion vitreum vitreum*). *J. Fish. Res. Bd. Can*., 33:2408-2419.

ZHANG, C. X.; SUZUKI, S. 2004. Aquabirnaviruses isolated from marine organisms from a distinct genogroup from other aquabirnaviruses. *J. Fish Dis.*, 27:633-643.

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 21

Principais parasitoses em peixes de água doce no Brasil

Eduardo Makoto Onaka

Resumo

No Brasil, com o avanço da piscicultura a partir da década de 80 começaram a surgir novas técnicas de criação e também alternativas quanto às espécies de peixes a serem cultivadas. Consequentemente, os problemas com parasitoses também apresentaram um incremento. Porém, as informações da literatura sobre a ocorrência de enfermidades, assim como de seus agentes causais, agentes predisponentes, aspectos patológicos ou métodos de controle têm aumentado nos últimos anos, mas estas ainda são reduzidas. Do mesmo modo, os criadores ainda são pouco informados sobre as técnicas corretas de manejo e sanidade de peixes. Neste capítulo, as principais parasitoses de peixes de interesse zootécnico do Brasil serão abordados.

Abstract

In Brazil, with the development of fish farming from the 80's, new techniques and alternative fish species to be cultivated began to emerge. Hence, the problems concernment to parasitosis also increased. In Brazil, despite the information about the occurrence of diseases, their causative agents, their agents predisposing, pathological aspects and methods of control have increased in the last years, they are still few. Similarly, farmers are still poorly informed about the correct techniques of management and health of fish. In this chapter, the main parasitosis of interest for fish culture will be discussed.

Introdução

As pisciculturas, particularmente as intensivas, assim como todas as grandes concentrações de animais, tendem a serem ambientes favoráveis a surtos epizoóticos devido a diversos fatores que favorecem o aparecimento de doenças. A alta densidade de estocagem aliada ao manejo de rotina que os animais sofrem são fatores causadores de estresse. Além disso, muitos organismos que são patogênicos facultativos tornam-se prejudiciais aos seus hospedeiros quando encontram situações propícias para sua proliferação.

No Brasil, existem poucos profissionais trabalhando no campo da Parasitologia e Patologia de Peixes, os quais dificilmente podem atender a crescente demanda. Há, portanto, necessidade de uma melhor divulgação por esses profissionais quanto ao uso de medidas preventivas e principalmente uma correta orientação quando ao uso de agentes terapêuticos, pois um erro no diagnóstico ou de dosagem poderá ser fatal e comprometer todo o plantel. Prieto et al. (1994) descreveram sucintamente uma chave de diagnóstico diferencial de 49 espécies de parasitos de peixes de água doce com importância zootécnica, através de um programa de desenvolvimento de aquicultura em Cuba. Ceccarelli et al. (1990) e Figueira & Ceccarelli (1991) relataram algumas doenças ocorridas no Centro de Pesquisas em Peixes Tropicais (Cepta), em Pirassununga, São Paulo. Békési (1992) relatou algumas parasitoses de peixes brasileiros, principalmente da região Norte do Brasil. Martins & Romero (1996) e Martins et al. (1995) observaram importantes alterações em peixes cultivados parasitados por mixosporídeos e monogenéticos. No Estado de São Paulo, estudos feitos por Martins et al. (2000, 2002) sobre levantamento das parasitoses em pisciculturas, relataram a maior ocorrência de parasitos helmintos da classe Monogenea. Uma abordagem dos principais parasitos encontrados em peixes de interesse zootécnico será feita a seguir. Assim, o objetivo deste capítulo é fazer uma abordagem das principais parasitoses encontrados em peixes de interesse zootécnico no Brasil.

Doenças causadas por Protozoários

Os protozoários talvez estejam entre os principais grupos de microrganismos que causam danos consideráveis às criações, pois sua reprodução é muito eficaz quando em ambiente favorável. Podem ser parasitos obrigatórios ou comensais que, sob certas circunstâncias, tornam-se muito patogênicos. Isto ocorre, principalmente, quando a relação hospedeiro-parasito-ambiente é afetada por condições ambientais e de manejo nas pisciculturas e pesque-pagues. Fatores como qualidade da água e temperatura podem afetar tanto o hospedeiro quanto o parasito. Rogers & Gaines (1975), relatam ainda que a reação dos peixes diante de tais infestações depende também do tamanho, idade, sexo e eficiência imunológica.

Ictiofitiríase

Doença causada pelo protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis.* De forma arredondada, ocasionalmente oval, mede aproximadamente 1,0 mm

quando adulto apresentando um típico núcleo central em forma de ferradura. Móveis, sua importância é grande devido ao fato de possuir um ciclo direto e que pode se completar em poucos dias, e também pela sua baixa especificidade parasitária. O parasito adulto é denominado *trofonte*, e está presente no tecido branquial ou na pele de peixes infectados. Atingindo a maturidade, sai do hospedeiro e aloja-se no substrato dos tanques de cultivo. Agora é denominado *tomonte*, que secreta uma parede cística e sofre divisões binárias, originando vários *tomitos* que se transformarão em *terontes*, que se espalham no meio após rompimento do cisto. Os terontes são as formas infectantes, claviformes e repletas de cílios. Os terontes precisam encontrar um hospedeiro em poucas horas, caso contrário morrerão. Nesta fase, seu tempo de vida depende das reservas energéticas e da temperatura da água. Ewing & Kocan (1988) demonstraram experimentalmente que existe a possibilidade de reprodução do parasito no epitélio do peixe, o que é de importância relevante, uma vez que novas infestações são favorecidas. Este tipo de reprodução é vantajoso para o parasito, pois quando este não encontra as condições adequadas para reprodução no ambiente aquático, o seu ciclo pode completar-se no hospedeiro. *I. multifiliis* pode ser encontrado na superfície do corpo, nadadeiras, olhos e brânquias dos peixes.

Sinais clínicos

Pontos brancos na superfície do corpo, nadadeiras e brânquias, hemorragias e posterior invasão bacteriana e/ou fúngica são sinais dessa doença (Figura 1). Anorexia, peixes vagando na superfície da água ou aglomerados na entrada da água, emagrecimento, excessiva produção de muco e o comportamento de raspar-se em pedras ou na parede do tanque também caracterizam a infecção. Predação e morte são outras consequências da doença.

Patogenia

Sua ação patogênica ocorre devido à penetração dos terontes no epitélio com a ajuda de uma estrutura chamada “perforatorium” localizada na extremidade do parasito. Após a penetração, ocorre a produção de mucocistos que promovem a sua fixação. Este fenômeno é muito importante, pois durante esta penetração pode haver necrose do tecido pelas substâncias secretadas, sendo responsáveis pela formação de uma cápsula gelatinosa sobre o parasito, de modo que esta o proteja do ambiente (Ewing et al., 1985). Esta camada sobre o parasito é responsável pela dificuldade de tratamento nesta fase da infestação. A nutrição deste importante parasito consiste principalmente de células do hospedeiro. Quando estão presentes no tecido branquial, são responsáveis pela perda funcional deste órgão, prejudicando a respiração e troca de sais com a água.

Ventura & Paperna (1985) observaram os efeitos patológicos deste parasito sobre ciprinídeos e bagres. Na porta de entrada do parasito observa-se a pele severamente irritada e opaca. Microscopicamente verifica-se vacuolização das células, picnose nuclear e a infiltração de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos. Terontes e trofontes jovens são observados na base e

na região mediana da lamela branquial. Células semidigeridas e resíduos celulares podem ser vistos dentro de vacúolos no citoplasma do parasito, o que sugere um crescimento do trofonte a partir de ingestão de células epiteliais. O crescimento do trofonte na membrana basal provoca deslocamento da camada superior do epitélio, como que acomodando o parasito na superfície do corpo do peixe. Observações feitas por Kurovskaya & Osadchaya (1993) e Martins et al. (2000) confirmaram a importância desta parasitose na criação, principalmente em alevinos de carpa, pacu, tambaqui, tambacu e traíra. Sin et al. (1994) observaram imunidade adquirida contra a doença em fêmeas de tilápias matrizes vacinadas contra *I. multifiliis* antes de desovarem. Após a desova houve sobrevivência de até 95% dos alevinos destas matrizes, mostrando que a imunidade pode não apenas ser via ovos, mas também por incubação dos ovos na boca da mãe, que é costume neste tipo de peixe.

Estes parasitos podem estar presentes normalmente em pequena quantidade nos peixes, sem causarem danos, mas se houver uma queda na resistência do hospedeiro por algum tipo de estresse, o parasito com certeza irá se desenvolver. O tratamento nas fases de tomonte e trofonte já bem avançadas é muito difícil, pois os peixes já se encontram muito debilitados para suportar algum tratamento. Não obstante, quando presentes, os trofontes secretam uma túnica mucilaginosa sobre si que impede a penetração do medicamento.
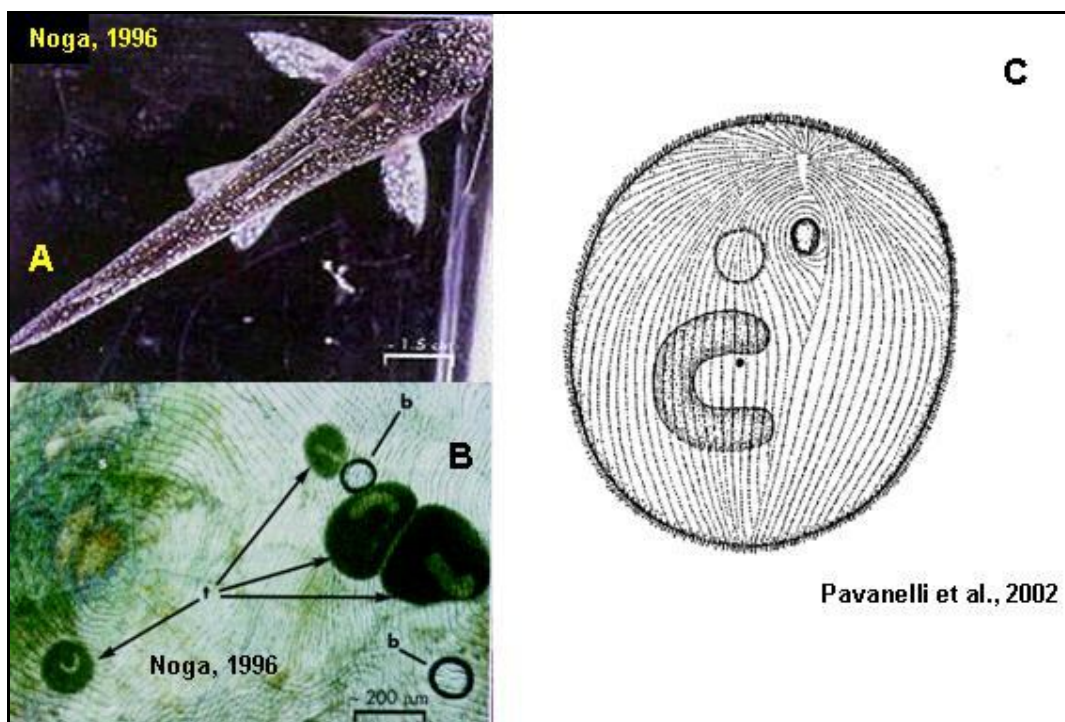
Figura 1. *Ichthyophthirius multifiliis.* (**A**) Infestação no epitélio. (**B**) Montagem úmida em lâmina. (**C**) Figura evidenciando núcleo e cílios.

Piscinodiníase

Doença causada pelo parasito dinoflagelado mastigóforo *Piscinoodinium pillulare* (= *Oodinium limneticum*), são parasitos com ciclo de vida muito parecido com *I. multifiliis*. São ectoparasitos de brânquias e de superfície do corpo de peixes de água doce, preferencialmente de águas tropicais. Não possui especificidade parasitária e invade o tegumento e brânquias dos hospedeiros. Seu corpo é piriforme ou em forma de saco, de cor castanho-amarelada. Mede até cerca de 160 µm de comprimento. Assim como *I. multifiliis*, suas formas jovens são infectantes e móveis, porém estas apresentam flagelos e são muito menores que os adultos (Figura 2). Ao aderirem ao hospedeiro, tornam-se imóveis até a fase adulta, quando então se soltam do peixe e tomam a forma arredondada ou oval, dando seguimento à várias divisões até a maturação final e rompimento do cisto. Fixam-se por meio de estruturas denominadas rizóides ou rizocistos. Os rizocistos penetram nas células do hospedeiro e provocam alterações estruturais e morte dessas células. Podem ocorrer em ambientes sem que tenha coincidido superpopulação, excesso de matéria orgânica e alteração na temperatura. O surgimento de *P. pillulare* pode também estar ou não associado a outros parasitos.
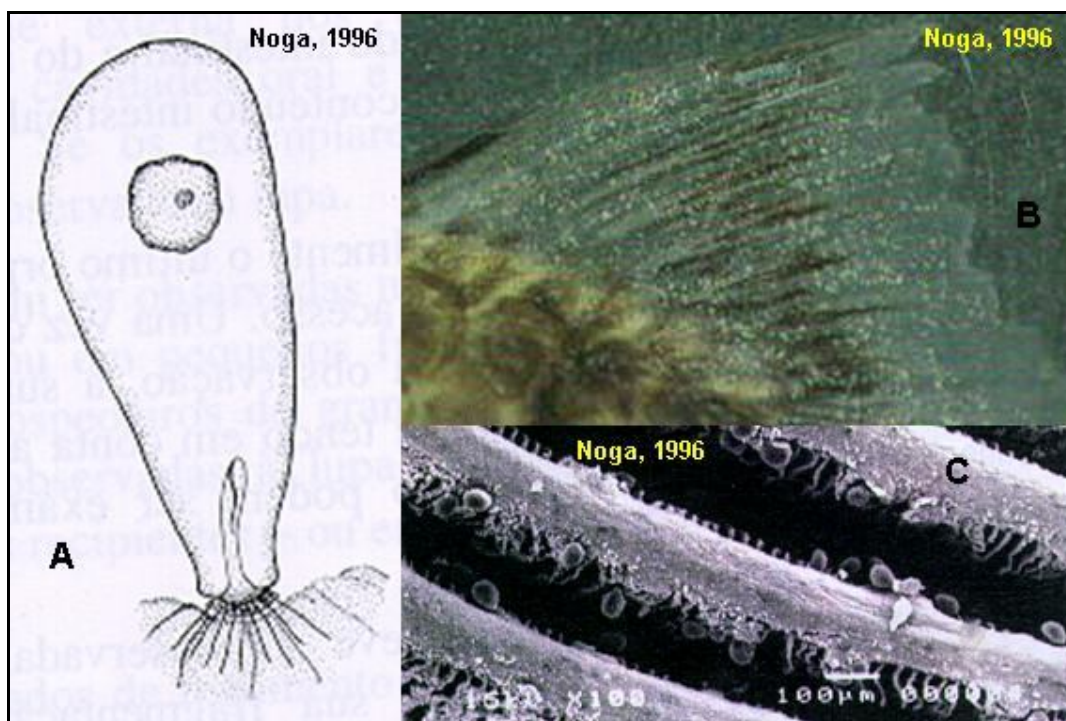
Figura 2. *Piscinoodinium pillulare.* (**A**) Gravura esquemática. (**B**) Infestação em nadadeira dorsal. (**C**) Micrografia de brânquias, visto em microscópio eletrônico de varredura.

Sinais clínicos

As brânquias ficam salpicadas de uma substância com coloração clara, lembrando pequenas partículas de “areia”. Quando na superfície do corpo e nadadeiras, podem provocar hemorragias e posterior invasão bacteriana e/ou fúngica. Os sintomas apresentam-se na forma de anorexia, peixes nadando rapidamente em círculos à flor d’água, vagando na superfície ou aglomerados na entrada da água, emagrecimento, excessiva produção de muco e o comportamento de raspar-se em pedras ou na parede do tanque.

Patogenia

Causam hemorragias petequiais no tegumento, degeneração e necrose das células afetadas, podendo haver inflamação. Quando nas brânquias, geram hiperplasia interlamelar nas lamelas secundárias, provocando diminuição da capacidade respiratória. Em poucos dias pode haver mortalidade maciça em peixes de piscicultura.

Tricodinose

A tricodinose é causada por protozoários ciliados do gênero *Trichodina* (Figura 3). Possuem forma circular e no centro do corpo pode-se observar um disco adesivo, rodeado por uma coroa de dentículos. Podem medir até 86 µm de diâmetro. Em microscópio pode-se visualizar facilmente os dentículos e seu movimento rotatório. São organismos que normalmente estão presentes nos tanques de piscicultura, e que proliferam-se rapidamente em águas com excesso de material em decomposição, atacando então, os peixes. Quando encontram ambientes favoráveis, podem parasitar a superfície do corpo, nadadeiras e brânquias dos animais. Algumas espécies podem ser endoparasitos.

Sinais clínicos

Os peixes parasitados apresentam-se debilitados, nadando na superfície da água, além de apresentarem hemorragias nos casos mais graves. Excessiva produção de muco também ocorre, tendendo a formar um delgado filme esbranquiçado sobre o corpo do peixe.

Patogenia

As lesões provocadas são algumas petéquias (pontos hemorrágicos) e desintegração do epitélio, freqüentemente abrindo caminho a infecções secundárias por fungos e bactérias. Lom (1973) comentou que as lesões não poderiam ser provocadas pelos dentículos, pois estes não sobressaem do nível do disco adesivo. Mas uma grande quantidade destes parasitos causa irritação do epitélio, resultando em injúrias celulares. Movimentos rotatórios e de sucção no tecido do hospedeiro em direção ao interior do corpo do parasito produzem lesões superficiais. Rogers & Gaines (1975) observaram hiperplasia e necrose da epiderme, bem como nadadeiras erodidas ou

desgastadas e perda de apetite. Geralmente os parasitos do gênero *Trichodina* são acompanhantes de outros parasitos, em alguns casos.
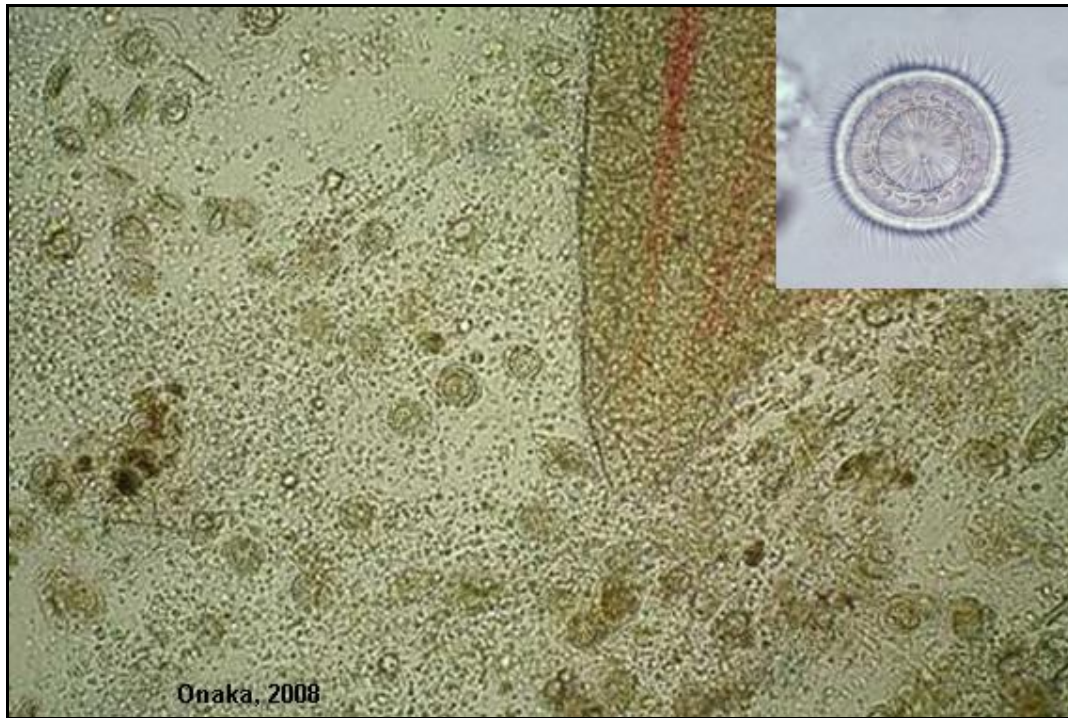
Figura 3. *Trichodina* sp. em brânquias de *Oreochromis niloticus*.

Ciliados Sessilina

Os protozoários ciliados da subordem Sessilina mais encontrados parasitando peixes são dos gêneros *Epistylis*, *Apiosoma* (=*Glossatella*) e *Ambiphrya*. São freqüentemente encontrados na superfície do corpo e brânquias de peixes de água doce, de qualquer classe de tamanho. Estão presentes normalmente em condições naturais, e podem se tornar patogênicos quando ocorre algum desequilíbrio entre o ambiente e o hospedeiro (Figura 4).
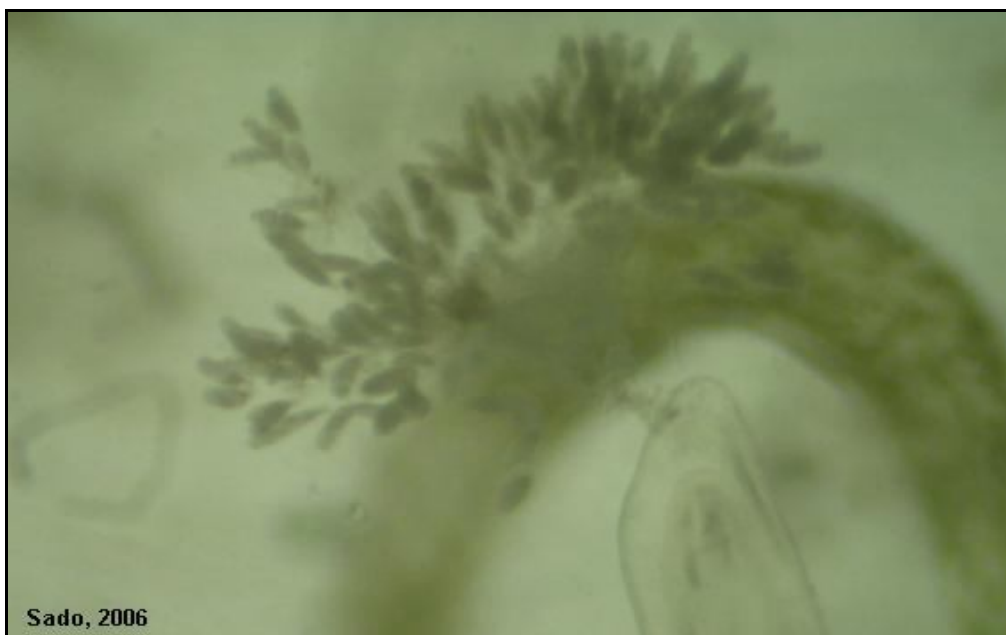
Figura 4. *Epistylis* sp colonizando brânquias de *Piaractus mesopotamicus*.
Sinais clínicos

Geralmente são assintomáticos, e ocasionalmente podem ocorrer mudanças na pigmentação do tegumento e excesso na produção de muco no corpo e brânquias. Estas últimas podem ter aparência hemorrágica. Infestação severa provoca anorexia e comportamento apático anormal.

Patogenia

Epistylis spp. pode provocar lesões tegumentares com aspecto hemorrágico. Pode ocorrer elevada mortalidade em peixes pequenos em caso de alta densidade associada com má qualidade da água.

Mixosporidiose

A mixosporidiose geralmente pode ser originada por um ou mais dos metazoários do Filo Myxozoa (mixosporídeos da família Myxobolidae). Os mais freqüentes são *Myxobolus* spp. e *Henneguya* spp (Figura 5). Imóveis, formadores de cistos em diferentes órgãos do corpo do hospedeiro, medindo aproximadamente de 20 a 70 µm de comprimento, apresentam corpo oval ou alongado com ou sem cauda, providos de cápsulas polares alongadas ou ovais que contém um filamento polar. O ciclo de vida destes parasitos é complexo e ainda não totalmente esclarecido. No caso do gênero *Myxobolus,* sabe-se que para seu desenvolvimento é necessário um hospedeiro intermediário, um anelídeo oligoqueto (*Tubifex tubifex*) presente no ambiente aquático (Markiw & Wolf, 1983). Anteriormente, considerava-se que seu ciclo

seria de peixes infectados mortos liberando os esporos para infectar novos hospedeiros. Sabe-se pouco sobre o ciclo de *Henneguya*. Este gênero é encontrado comumente parasitando peixes brasileiros como o pacu, formando cistos de aproximadamente 1 mm de diâmetro dentro dos filamentos branquiais. Observações feitas em pacus selvagens capturados no Rio Aquidauana (MS) relataram cistos de *Henneguya* sp. nas brânquias e esporos de *Henneguya* sp. e *Myxobolus* sp. no rim, baço, fígado, coração e vesícula biliar (Campos et al., 2004). Esporos de *Myxobolus* sp. foram encontrados com freqüência no cérebro de pacus *P. mesopotamicus* do Rio Aquidauana (Campos, 2006). *Myxobolus colossomatis* (46,6%) foi encontrado na pele de tambaquis *Colossoma macropomum* cultivados na estação experimental de piscicultura, em Manaus/AM (Tavares-Dias et al., 2006).

Quando ocorre na musculatura, brânquias, olhos, fígado, rim, coração, baço, vesícula biliar e gônadas, formam cistos de coloração creme. *M. cerebralis* ocorre na cartilagem cerebral. Outras espécies deste gênero podem ocorrer nas brânquias, musculatura, olho, rim, fígado, coração, baço, vesícula biliar e gônadas também (Eiras, 1994; Noga, 1996).
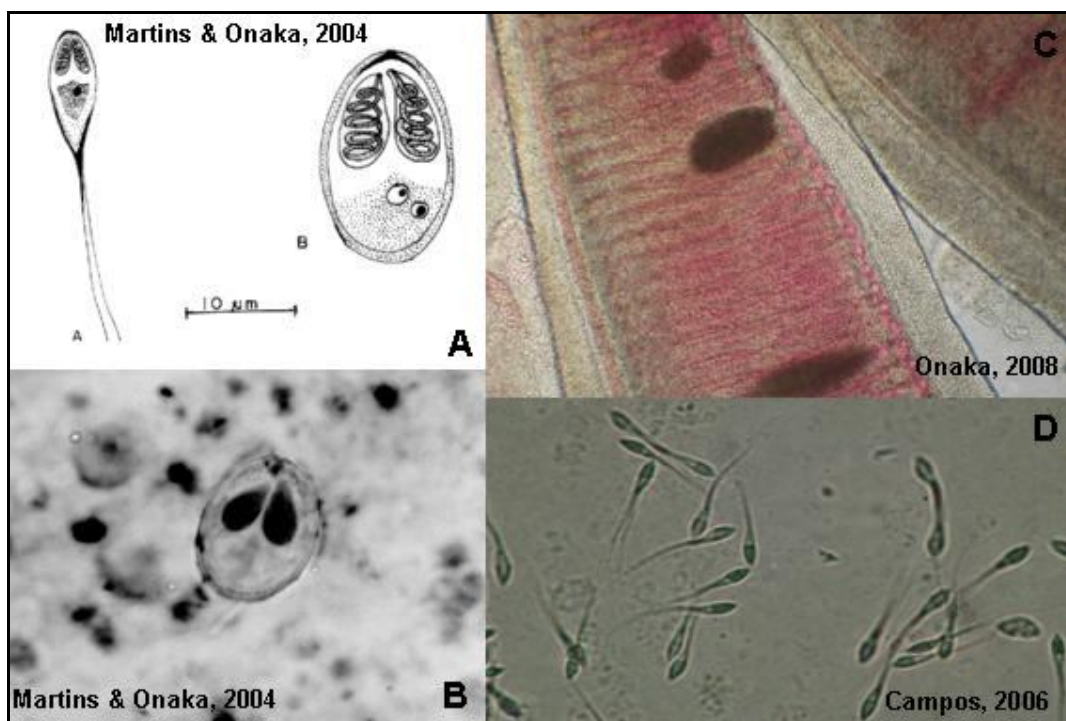
Figura 5. *Myxobolus peculiaris* (**A-A**), *Henneguya garavelli* (**A-B**), *Myxobolus peculiaris* (**B**), Cisto de *Henneguya souzai* (**C**), Esporos de *Henneguya piaractus* (**D**).

Sinais clínicos

Peixes parasitados por *M. cerebralis* nadam em círculos, lordose e escoliose, escurecimento da pele ou de um só lado do corpo. Enquanto que *Henneguya* sp. provoca inicialmente em primeira instância anorexia, aglomeração de peixes na entrada da água ou nado lento na superfície da água.

Patogenia

Brânquias hemorrágicas, inchadas com presença de cistos escuros nas lamelas branquiais, podem apresentar coloração marrom na extremidade dos filamentos branquiais. Hemorragias renais também são encontradas (Martins et al.,1995). Salmonídeos parasitados por *M. cerebralis* apresentando estes sinais da doença são levados à morte por anorexia e alterações na coluna vertebral. Quando ocorre este tipo de doença fatal na criação de salmões e trutas (Post, 1987) a melhor maneira de erradicar o problema é a desinfecção geral dos tanques/viveiros da propriedade, pois ainda não existe um tratamento eficaz e seguro. Parasitos do gênero *Henneguya* podem ser responsáveis por grande mortalidade em pacus cultivados quando associados a outros parasitos branquiais, onde comprometem totalmente a função respiratória do órgão. Quando há presença de cistos nos filamentos branquiais, ocorre maior contato célula a célula das lamelas secundárias, diminuindo a superfície de absorção de oxigênio, bem como aumento no número de células caliciformes na extremidade dos filamentos branquiais, podendo chegar à hiperplasia e hipertrofia dos órgãos afetados (Martins et al., 1995). Quando presentes no rim podem alterar o equilíbrio hidroeletrolítico do organismo. Este parasitismo pode provocar queda na resistência dos peixes, deixando-os susceptíveis a infecções secundárias.

Doenças causadas por helmintos

A- Filo Plathyelminthes

a) Classe Monogenoidea

Helmintos da classe Monogenoidea, também chamados de monogenóides, monogenoídeos ou monogenéticos (Figura 6), possuem forma alongada e achatada. São hermafroditas em sua maioria, medindo aproximadamente, 400 a 800 μm de comprimento, são providos de ganchos marginais ou âncoras na extremidade posterior do corpo denominada opisthaptor e, por vezes, ventosas na extremidade anterior denominada prohaptor. Na região mediana do corpo encontra-se a estrutura reprodutiva chamada de cirrus. Esta estrutura, aliada aos ganchos, é de grande importância taxonômica para a sua classificação. Localizam-se, principalmente, nas brânquias, pele e fossa nasais Até oito espécies de monogenéticos podem ser encontradas em um único peixe. Possuem ainda alta especificidade parasitária.

Conforme Thatcher & Neto (1994) os monogenóides são helmintos ectoparasitos hermafroditas que têm ciclo de vida direto nos peixes de água doce neotropicais, facilitando o contágio. Os indivíduos adultos liberam ovos dos quais saem larvas ciliadas chamadas oncomiracídios, que obrigatoriamente precisam encontrar o hospedeiro em algumas horas, senão morrerão. Não têm ocorrido de forma sazonal, e comprometem principalmente criações de larvas e peixes jovens, já que os adultos parecem ser mais resistentes.

É importante destacar que a patogenicidade não é comum e a morte do hospedeiro não favorece a transmissão. Na maioria dos casos, a seleção natural resulta em organismos que causam um mínimo de prejuízo ao hospedeiro. As epizootias são resultados de uma ruptura no relacionamento equilibrado do hospedeiro com o parasita, criada por condições artificiais (Vargas, 2001).
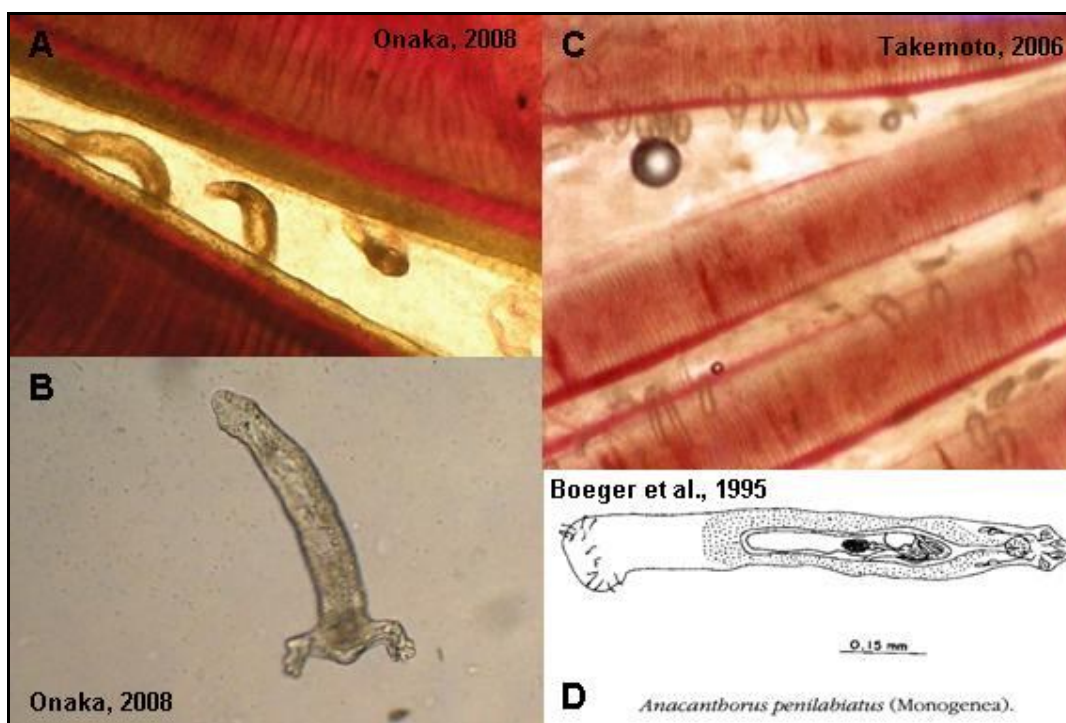
Figura 6. Monogenea. (**A-B**) Exemplares em brânquias. © Diplectanídeo de *Plagioscion squamosissimus*. (**D**) gravura de *Anacanthorus penilabiatus* de *P. mesopotamicus*.

Acredita-se que, na fauna de peixes tropicais, cada espécie de peixe possua cerca de cinco espécies de Monogenoidea. Como no Brasil a fauna de peixes é representada por mais de 2000 espécies, é possível imaginar que

deva haver cerca de 10000 diferentes espécies desses parasitos. No entanto, até o presente momento, apenas cerca de 250 são conhecidas. Os Monogenoidea parasitos de peixes de água doce pertencem principalmente a duas grandes famílias: a dos dactilogirídeos e a dos girodactilídeos (Pavanelli et al., 2002).

A primeira é constituída de parasitos que se reproduzem liberando ovos. A segunda engloba as espécies vivíparas. Os membros da família Dactylogyridae formam um grupo de parasitas predominantemente das brânquias de peixes teleósteos, tanto de água doce como salgada. Todos são ovíparos e relativamente pequenos, possuem preferência de se fixarem nas brânquias, podendo ocorrer nas narinas e na superfície do corpo e mais raramente no ducto excretor. Possuem ciclo vital direto. O ovo depositado na água doce eclode e libera uma larva chamada de oncomiracídeo que nada ativamente à procura de um novo hospedeiro.

Já os girodactilídeos preferem parasitar a superfície do corpo. Existem algumas excessões de monogenóides que são endoparasitos, como *Polystoma* sp, que parasita a bexiga urinária de anfíbios, e do *Enterogyrus cichlidarum*, que atinge vísceras de *Tilapia mossambica* (Noga & Flowers, 1995). Esta é uma importante família que se reproduz pelo processo de poliembrionia seqüencial, são vivíparos e, portanto, não passam pela fase de oncomiracídeo. A temperatura parece ser um fator de grande importância na reprodução desses parasitos.

Kritsky et al. (1988a) descreveram espécies do gênero *Rhinoxenus* infestando cavidade nasal de peixes da Amazônia. *R. piranhus* para *Serrsalmus nattereri* (piranha), *R. arietinus* para *Schizodon fasciatum* e *Rhytiodus argenteofuscus*, *R. nyttus* para *S. fasciatum* e duas espécies do gênero *Schizodon* não identificadas para *S. fasciatum* e *Hydrolycus scomberoides*. A espécie *Rhinonastes pseudocapsaloideum* n. gen., n. sp. parasito da cavidade nasal de curimatã *Prochilodus nigricans* também foi descrita por Kritsky et al. (1988b).

Em Pirassunuga (SP), Ceccarelli et al. (1990) em um levantamento sobre a ocorrência sazonal de parasitos no Cepta, constataram a ocorrência de Dactylogyridae nas espécies cultivadas, sendo a sua maior incidência nos meses de março a abril, mas não sendo os principais causadores das enfermidades naqueles peixes. Souza et al. (2000) notaram que *A. penilabiatus* está em franca expansão pelos pesque-pague e piscigranjas, no estado de São Paulo. Segundo Tavares-Dias et al. (2001) na região nordeste do Estado de São Paulo, não foi observada ocorrência sazonal para dactilogirídeos, porém, estão presentes o ano todo, embora a carga parasitária em *P. mesopotamicus* e *Leporinus macrocephalus* seja menor no inverno, aumentando na primavera e verão, acompanhando o aumento de temperatura. *Dactylogyrus vastator*, ocorre com grande incidência em tanques de alevinagem sendo quase sempre deletério, quando associado a *I. multifiliis* e a *Trichodina* (Figueira & Ceccarelli, 1991).

Garcia et al. (2002) encontraram *Urocleidoides* sp., um monogenóide da família Dactylogyridae, nas brânquias de *Xiphophorus* sp. de piscicultura, em Araraquara, São Paulo.

Em ensaio realizado por Onaka et al. (2001) para verificação de alterações hematológicas de pacu com infestação natural por monogenódes submetidos a tratamentos com levamisol e mebendazol, conjugados ou não,

a parasitose por *A. penilabiatus* nas brânquias não interferiu negativamente de forma significativa sobre os parâmetros hematimétricos dos peixes.

Fujimoto et al (2002) avaliaram a intensidade parasitária de monogenéticos em juvenis de pacus quando suplementados com cromo na dieta e observaram grande interação entre os níveis de cromo e as densidades de estocagem, mostrando que na menor densidade de estocagem a adição de 12 a 18 ppm de cromo na ração propiciou uma diminuição do número de monogenéticos.

Boeger et al. (1995) descreveram *A. penilabiatus* nas brânquias de alevinos de pacu de cultivo, no Estado do Paraná, os quais apresentaram mortalidade devido à alta carga parasitária. Merlini et al. (2002), em um levantamento de ectoparasitos em tilápia do nilo *O. niloticus*, em pesque pague de Umuarama (PR), observaram uma ocorrência total de 60%, tendo os *Dactylogyrus* uma ocorrência de 53,3%. Popazoglo (1997) encontrou seis espécies de *Gyrodactylus* em *Corydoras paleatus* e *C. ehrardti*, capturados no Rio Piraquara, Curitiba, PR.

Registro de *A. penilabiatus* para dois novos hospedeiros, *C. macropomum e C. brachypomum*, ambos de cultivo, foi feito por Pamplona-Basilio & Kohn (2001), no Rio de Janeiro. Boeger & Popazoglo (1995) coletaram *Gyrodactylus geophagensis* n. sp. na superfície do corpo de cará *Geophaus brasiliensi, no Rio da Guarda* e *Gyrodactylus trairae* n. sp. na superfície do corpo de traíra *H. malabaricus*, no Rio Guandu, ambos no Estado do Rio de Janeiro.

Campos et al. (2002) relataram a ocorrência de Dactylogyrydae em *P. mesopotamicus*, cultivados em viveiro em Aquidauana (MS). Na Amazônia, Tavares-Dias et al.(2006) encontraram *Anacanthorus spathulatus* na pele e brânquias de tambaqui *Colossoma macropomum* cultivados.Em Brycon amazonicus, cultivados nesta mesma região, Malta et al. (2009) relatam a ocorrência de *Jainus amazonensis*, *Anacanthorus spiralocirrus Tereancistrum kerri* e *Trinibaculum brazilensis*. Em ambiente natural tem sido observado, em trabalho em andamento, monogeneas desta família em *P. mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus*, *Pseudoplatystoma fasciatum* e *Schizodon borelli*, capturados no Rio Aquidauana (Campos, 2006).

O grau de severidade desta doença vai desde leve, sem resposta tecidual incrementada até um parasitismo grave com hiperplasia, focos necróticos, edema, desprendimento do epitélio e ruptura de células pilares.

A abundância populacional de *Gyrodactylus* spp. é geralmente maior nos meses de inverno e outono quando as temperaturas são mais baixas. Além da temperatura as condições de estresse do hospedeiro, motivadas pela reprodução, podem também influenciar positivamente o número de parasitas (Eiras, 1994). No útero de um exemplar pode ser observado, à transparência, um outro exemplar semelhante ao adulto e dentro desse, ainda, um outro exemplar.

Sinais clínicos

Peixes com monogenose apresentam, de forma geral, intensa produção de muco nas brânquias e superfície corporal do peixe, modificando o comportamento do mesmo. Úlceras na pele e lesões nas brânquias também são observadas (Pérez, 1999). O peixe passa a se esfregar nas paredes do

tanque ou em objetos no fundo do aquário, na tentativa de se livrar-se do parasito provocando lesões e ferimentos no corpo dos peixes e abrindo entrada para outras infecções secundárias. Também sobem à superfície da água. Ocorre anorexia, hemorragias cutânea e branquial, inchaço nos filamentos branquiais, emagrecimento e morte do animal.

Patogenia

Pelo modo que seus ganchos de fixação agem no corpo ou nas brânquias do hospedeiro, causam hiperplasia e hipertrofia branquial, hemorragias extensas e necrose do tecido. Poucos indivíduos podem ser responsáveis por mortalidade, desde que haja queda na qualidade da água e do oxigênio dissolvido. Esta infestação que nitidamente incomoda o peixe pode resultar em infecções secundárias por bactérias e fungos. Dessa forma não é descartada a hipótese de mortalidade em peixes adultos quando em condições aquáticas são inadequadas.

Quando fixos nos tegumentos provocam lesões pouco acentuadas quando comparadas às infecções branquiais.

b) Classe Digenea

Os digenéticos são endoparasitas platelmintos com ciclo evolutivo que necessitam de pelo menos um hospedeiro intermediário. Os estádios de larvas e adultos podem ser encontrados nos peixes, sendo que a larva encontra-se freqüentemente encistada (Pérez, 1999). Possuem a forma de folha, podendo ser alongados ou ovais, variando de 700 a 3000 μm de comprimento, chegando em algumas espécies, a atingir até vários centímetros. São quase todos hermafroditas com aparelho reprodutor complexo e providos de ventosa oral e acetábulo na região mediana do corpo (Figura 7).

Ao contrário dos Monogenea, os Digenea necessitam de um hospedeiro intermediário, geralmente um molusco, para completar seu ciclo de vida. Aves piscívoras ou peixes carnívoros que carregam o parasito adulto no intestino liberam ovos junto com as fezes, dos quais eclodem uma larva ciliada, o miracídio. Este é ingerido por um molusco, onde se desenvolvem a rédia e depois em cercárias. Estas abandonam o molusco e procuram um peixe apropriado para evoluírem em metacercárias, onde permanecem encistadas à espera que o hospedeiro definitivo se alimente do peixe parasitado.

A enfermidade metacercariose é causada por metacercárias que encistam na pele, músculo, sistema nervoso, gônadas, olhos, nadadeiras de peixes de água doce e marinha. Ao redor do cisto, observam-se depósitos de melanina, dando um aspecto enegrecido aos cistos. Esta enfermidade é chamada de “blackspot”, doença dos pontos negros. Os peixes quando estão altamente infestados apresentam um aspecto desagradável, não crescem e perdem valor comercial.
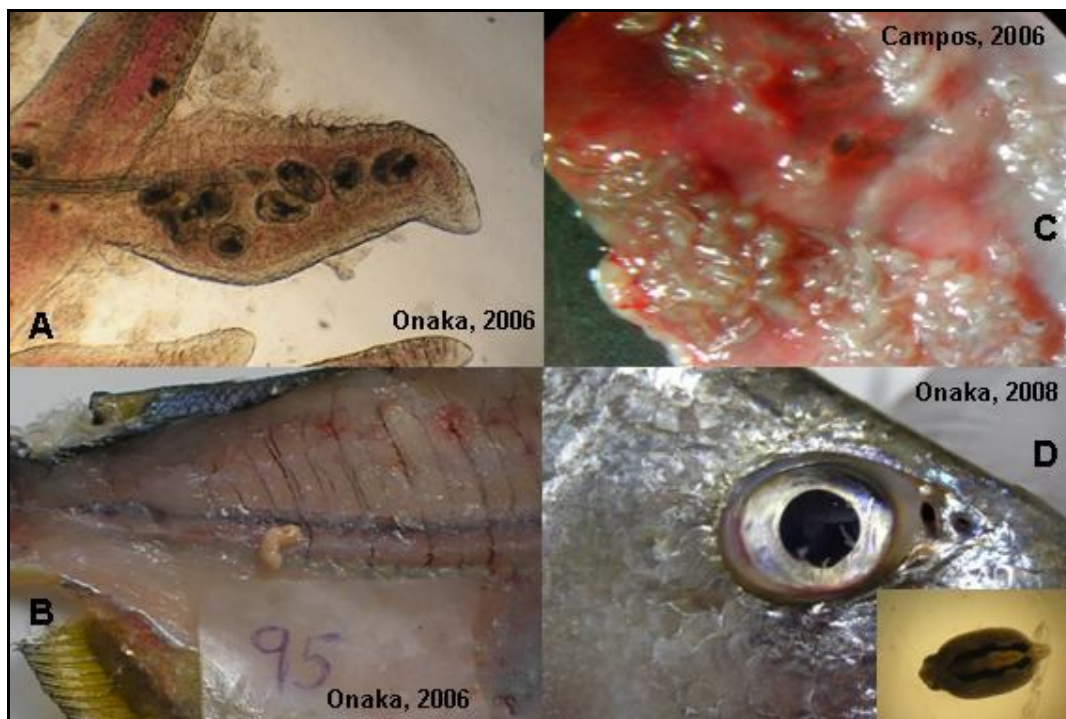
Figura 7. Digenea. (**A**) Encistado em brânquias. (**B**) Encistado na musculatura. (**C**) *Dadaytrema oxycephala* obstruindo o canal intestinal de *Piaractus mesopotamicus*. (**D**) Metacercárias (*Austrodiplostomum compactum*) em olho de *Plagioscion squamosissimus*

Uma das maiores e mais variadas das famílias de trematódeos digenéticos é a Didymozoidae. Trematódeos pertencentes a esta família são parasitos dos tecidos de peixes, sendo encontrados debaixo da pele, dentro das brânquias, dentro da parede do trato digestivo, dentro dos ovários, atrás dos olhos e na cavidade peritoneal. Embora a maioria seja hermafrodita, os sexos estão separados em alguns gêneros. *Brasicystis benetti* n. gen., n. sp. foi a terceira espécie parasita de peixe de água doce encontrada no mundo, sendo foi citada por Thatcher (1979a).

Fortes et al. (1996) registraram duas espécies de trematódeos digenéticos de traíra *H. malabaricus* do Lago Guaíba (RS): *Pseudallacanthochasmus grandispinis* Velasques, 1961, no intestino e metacercárias de *Ithyoclinostomum.* Malta et al. (2009) relataram metacercária de tretatóides no cecos pilóricos, mesentério e intestino matrinxã *B. amazonicus* coletados no Lago Catalão e Rio Solimões e piscicultura do Amazonas.

Campos (2006) encontrou *Dadaytrema* sp. no intestino de pacus capturados no Rio Aquidauana (MS). Guidelli et al. (2002) descreveram *Sanguinicola platyrhynchi* n. sp., um digenético parasita da cavidade visceral de *Hemisorubim platyhrynchos*, peixe conhecido como jurupoca na planície de inundação do alto Rio Paraná. Posteriormente, Guidelli et al. (2003) registraram, para essa mesma espécie de peixe, quatro espécies de digenéticos: *Crocodilica pseudostoma*, *Sanguinicola platyrhynchi*, *Sphincterodiplostomum* sp e uma espécie pertencente à família Gorgoderidae.

No reservatório de Volta Grande (MG), Martins et al. (1999) relataram a ocorrência de *Diplostomum* sp. no globo ocular de *P. squamosissimus* (corvina). No Brasil, ainda não foram diagnosticados casos de mortalidades provocadas por metacercárias no olho de peixes, porém Evans et al. (1976) comentaram que dependendo do tamanho do peixe, cerca de 40 metacercárias encontradas por olho podem causar catarata e cegueira.

Sinais clínicos

No caso de *Diplostomum spathaceum*, as metacercárias se encontram nos olhos de peixes silvestres ou de cativeiro, provocando movimentos lentos e anorexia por causa da cegueira. Trematódeos adultos da família Paramphistomidae como *Dadaytrema oxycephala* ou outros, podem causar dilatação intestinal, se em grande número (Thatcher, 1979b).

A importância dos trematódeos em peixes está principalmente no estágio de metacercária, quando se localizam no olho, e no caso de *Clinostomum marginatum,* provocam manchas amarelas ao longo da epiderme dos peixes parasitados. Essas manchas são decorrentes do acúmulo de melanina ou pigmento da epiderme ao redor do parasito.

As metacercárias podem também ser observadas nas brânquias dos peixes. Formam nódulos de 2 a 4 mm de tamanho. A doença das manchas negras em peixes é decorrente de trematódeos dos gêneros *Neascus, Diplostomum ou Metagonimus* que encistam na musculatura. Os peixes afetados mostram sinais de nervosismo, movimentos desordenados, petéquias na pele e zonas de escurecimento devido ao acúmulo de melanina que rodeia a metacercária.

Patogenia

A patogenicidade de *D. spathaceum* está relacionada à catarata dos olhos de peixes, que param de se alimentar, tornam-se apáticos e, portanto, presas fáceis (Rogers et al., 1983). Outros trematódeos adultos podem causar obstrução intestinal, se em grande número, e emagrecimento do hospedeiro ao longo do tempo por competição por nutrientes.

A migração das metacercárias no corpo do hospedeiro pode, em alguns casos, causar castração parasitária. A penetração ativa destas formas imaturas pode provocar exoftalmia nos peixes. Castelo (1984) observou em jaraquis, que devido à seca nos rios da Amazônia, os peixes encontram-se mais próximos do fundo onde localizam-se as macrófitas, diminuindo a distância entre o peixe e as metacercárias. Foram observados casos esporádicos da diplostomíase em peixes de cultivo no Brasil e sem causar

danos significativos, mas esta parasitose ocorre mais frquentemente em peixes de ambiente natural. Thatcher & Varella (1980) relataram tumor maligno em brânquia associado as metacercárias de *Ascocotyle* sp. (Heterophyidae), em peixes da Amazônia (*Chaetobranchus semifasciatus*; Cichlidae). *Dadaytrema* sp. está presente em pacus e segundo Conroy (1987) podem causar perda de apetite, apatia, coloração opaca no corpo, descamação das nadadeiras e perda de equilíbrio, o que pode ser confundido com columnariose.

c) Classe Cestoda

Os cestóides são endoparasitos do grupo dos platelmintos, conhecidos popularmente por tênias (Figura 8). Uma de suas principais características é o fato dos adultos serem encontrados sempre no intestino dos peixes, porém as larvas podem ser vistas na cavidade visceral e órgãos em geral. O ciclo evolutivo das tênias de peixes é complexo, envolvendo quase sempre mais dois hospedeiros. O primeiro hospedeiro intermediário é sempre um microcrustáceo e o definitivo pode ser representado por peixes, aves e mamíferos, inclusive o homem.

De maneira geral, os peixes suportam bem o parasitismo, determinados pelos cestóides adultos, pois estes parasitas retiram apenas alimento necessário para sua sobrevivência. Danos mais sérios, entretanto, podem ser observados quando os parasitos utilizam estruturas de fixação mais eficientes e que podem determinar alterações importantes do ponto de vista histopatológico, nas camadas que constituem o intestino do hospedeiro. Deve-se considerar ainda a possibilidade de os parasitas causarem oclusão da luz intestinal devido à alta intensidade de infecção, muitas vezes, fatais para o hospedeiro.

No que se refere às larvas, estas são encontradas nos peixes quando estes funcionam como hospedeiros intermediários ou de espera. São chamadas de plerocercóides e quando se encontram alojadas no intestino dos peixes podem provocar hemorragia temporária, seguida de alguma reação inflamatória. Em alguns casos pode ocorrer reação não específica por parte dos hospedeiros determinando a encapsulação (formação de cistos) da larva na própria parede intestinal. Em outros, elas passam para o mesentério ou superfícies dos órgãos internos, onde se encistam. Os plerocercóides encapsulados podem ser encontrados em grandes números e quando presentes na parede intestinal podem diminuir a capacidade dos peixes de absorverem nutrientes (Pavanelli et al., 2002).
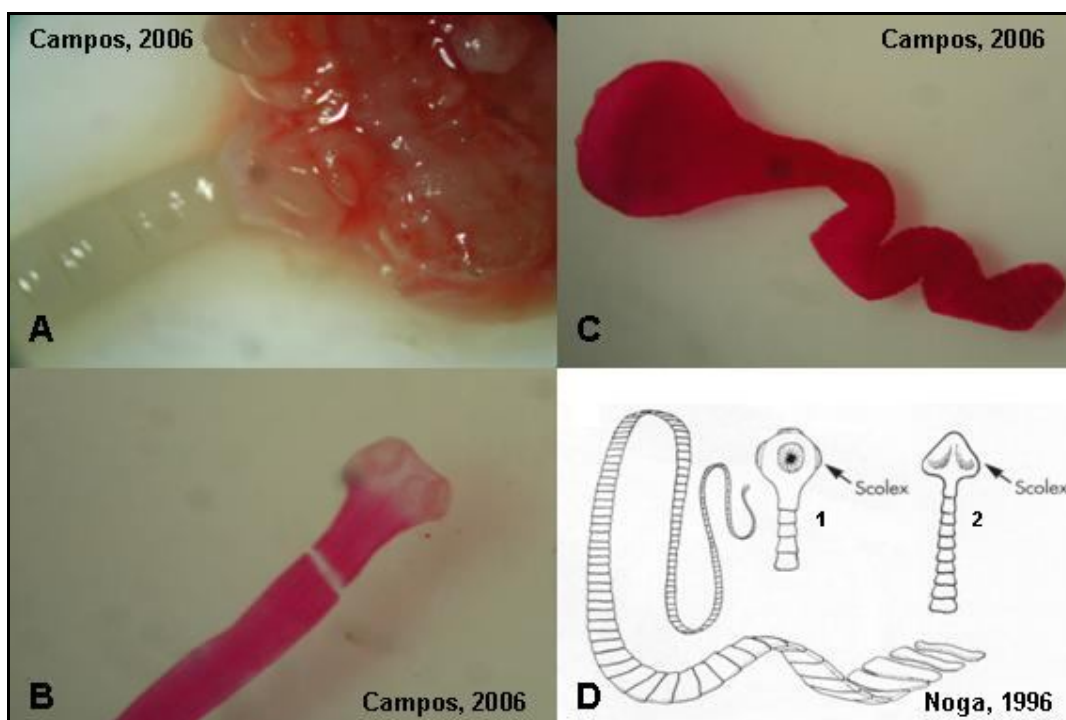
Figura 8. Cestoda. (**A**) Proteocefalídeo aderido ao epitélio intestinal de *Pseudoplatystoma fasciatum*. (**B-C**) Exemplares corados com carmim. (**D**) Gravuras de escólex de Proteocefalídeo (**1**) e de Pseudofilídeo (**2**).

Em levantamento no Rio Paraná, Machado et al. (1995) observaram que em pintado *P. corruscans*, a única espécie de parasito que apresentou relação entre intensidade de infecção e o ambiente foi *Spasskyelina spinulifera*. Mas, com relação ao nível de água somente três espécies *S. spinulifera*, *Nomimoscolex subodim* e *Megathylacus travassoi* apresentaram intensidade média mais alta no período de cheia.

Pavanelli & Takemoto (1995) descreveram duas espécies novas para o gênero *Proteocephalus*: *P. vazzolerae* n. sp. e *P. chubbi* n. sp. encontradas em *P. mesopotamicus* e *Gymnotus carapo*, respectivamente. Rego & Pavanelli (1987) descreveram duas espécies de cestóides proteocefalídeos encontradas em jaú *Paulicea luetkeni*: *Jauella glandicephalus* e *Megathylacus brooksi*. Estes também descreveram para jaú, *Travassiela avitellina* gen. N., sp. n. e redescreveram e registraram pela primeira vez para jaú o cestóide *Peltidocotyle rugosa*. Guidelli et al. (2003) examinando *Hemisorubim platyrhynchos* coletados no Rio Paraná observaram *Goezeela paranaensis*, *Spatulifer maringaensis* e *Mariauxiella piscatorum*.

Para ciclídeos foram registrados para *Cichla ocellaris* o cestóide *Proteocephalus macrophallus* por Scholz et al. (1996) e para *Cichla monoculus* a espécie *Sciadocephalus megalodiscus* por Rego et al. (1999).

No Pantanal, MS, exemplares de cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* capturados no rio Aquidauana no mês de novembro de 2003 apresentaram no intestino as seguintes espécies de cestóides: *Harriscolex kaparari*, *Peltidocotyle rugosa*, *Choanoscolex abscisus*, *Nomimoscolex* sp., *Spatulifer rugosa* e *Megathilacus travassoi* (Campos, 2006).

Sinais clínicos

Geralmente não apresentam sintomas característicos, estando relacionados com a espécie do parasito, com a fase de desenvolvimento, com o número de parasitos existentes, além da espécie do hospedeiro.

Animais comprometidos apresentam inchaço na região ventral, podendo ser visualizado o próprio parasito nos órgãos internos e mesentério, quando da necropsia do mesmo.

Em animais de cultivo, a ocorrência não é muito comum, pois o ciclo desses parasitos é mais complexo, exigindo dois hospedeiros intermediários, sendo que, muitas vezes, o segundo hospedeiro é uma ave ou um mamífero.

Patogenia

Podem causar compressão visceral que provoca anorexia e também castração parasitária. A localização nos órgãos vitais do peixe, como coração, baço e cérebro, pode causar grande prejuízo na criação (Pellitero, 1988). Estudos com plerocercóides de *Triaenophorus noddulosus* foram feitos por Hoffmann et al. (1986) em diversos peixes que apresentaram freqüentemente migração dos parasitos por ductos biliares acompanhados de macrófagos e células epitelióides. A larva media 10-70 µm e o plerocercóide 320 µm. Os autores observaram aumento destes ductos parasitados. Observaram ainda que a calcificação é muito comum quando as cápsulas que envolvem os parasitos são de maior tamanho.

Schäffer et al. (1992) observaram em peixes capturados no Pantanal e no Rio Paraná, ocorrência de larvas de cestóides encistadas. Os nódulos foram observados no peritônio, no parênquima do fígado e baço e estavam envolvidos por uma outra cápsula de tecido conjuntivo do órgão afetado. A cápsula foi formada pela proliferação de fibroblastos arranjados concentricamente. Foi localizado também um material amorfo entre o cisto larval e o nódulo da cápsula. Entretanto, segundo os autores, vários nódulos foram tomados pelo crescimento de estruturas granulomatosas ou em estágios mais avançados, por uma massa amorfa eosinofílica.

B - Filo Nemathelminthes

Os nematóides são vermes cilíndricos e alongados, encontrados na água e no solo, como forma de vida livre, ou como parasitos invasores de plantas e animais (Figura 9). Os nematóides adultos, em peixes, vivem no trato digestivo ou nas cavidades corpóreas. Existem quatro estágios larvais antes do adulto e, no caso das formas parasitárias de peixe, o primeiro estágio larval é livre na água e aos outros estágios são parasíticos.
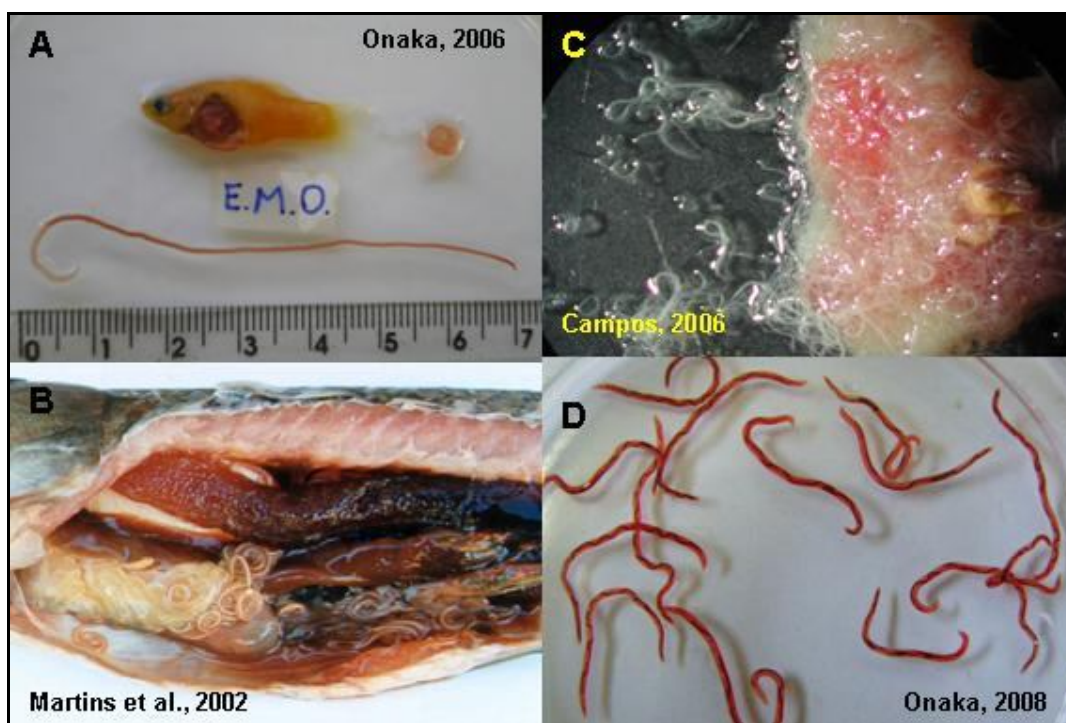
Figura 9. Nematóides. (**A**) Eustrongylidae em *Xiphophorus* sp. (**B**) Larvas de *Contracaecum* sp. no mesentério de *Hoplias malabaricus*. (**C**) *Rondonia rondoni* em intestino de *P. mesopotamicus*. (**D**) *Spirocamallanus* sp. de *Metynis maculatus*.

Os danos causados por nematódeos em peixes variam muito, dependendo da espécie presente, do órgão invadido e do número de parasitas envolvidos (Thatcher & Neto, 1994).

No peixe, os nematóides adultos podem viver no intestino ou nas cavidades do corpo e as larvas na musculatura (Vargas, 1998).

Algumas espécies de nematóide, como é o caso dos anisaquídeos, são importantes em saúde pública, já que quandoingeridos pelo homem, podem causar zoonoses e apresentar sintomas merecedores de cuidados médicos.

Sinais clínicos

Geralmente é assintomático. Anorexia, perda de peso, anemia e morte podem ser relatadas. Diagnóstico positivo é confirmado em necropsia, onde se verificam larvas na parede interna do trato digestório e dentro da musculatura, no mesentério e nas vísceras dos peixes.

Quando ocorrem infestações por nematóides, geralmente não se observam sintomas específicos, pois em muitas vezes a larva do parasito se encontra encistada, e exames histopatológicos indicam que não ocorrem

muitas alterações importantes no tecido dos peixes. Os vermes adultos geralmente são assintomáticos, mesmo em grandes infestações.

Patogenia

Sua patogenia é ainda um pouco discutida, mas em algumas ocasiões pode causar fibrose ao redor do cisto (Eiras & Rego, 1989). Há redução do crescimento do peixe devido ao alto grau de infecção com conseqüente prejuízo zootécnico. As larvas podem ser destruídas em temperatura de 60ºC ou por congelamento durante 24 h a – 20ºC. *Eustrongylides* spp. encistados nas gônadas, freqüentemente provocam castração parasitária.

Em peixes de cativeiro, a patogenia relaciona-se com a possibilidade de ocorrer obstrução intestinal do hospedeiro por uma grande intensidade de nematóides, ou devido ao pequeno tamanho do hospedeiro. Em muitos casos, verifica-se que o parasito apenas se alimenta do conteúdo intestinal, competindo com o hospedeiro na absorção de nutrientes. Mas em alguns casos, como em infestações por *Goezia leporini*, a patogenia é bem severa, ocorrendo mortalidade em piauçus de 20 cm com apenas 6 parasitos adultos fixados no estômago. No caso de *Eustrongylides* sp., uma grande infestação pode fazer com que o peixe seja descartado para consumo, devido ao seu aspecto repudiante.

Nematóides das famílias Camallanidae, Cucullanidae e Philometridae vivem geralmente no intestino de peixes, alguns no fígado. As larvas atravessam a parede intestinal, penetram nos vasos sangüíneos e alojam-se na cavidade. Geralmente necessitam de hospedeiros intermediários, como crustáceos do grupo Ciclopoidea (*Cyclops* sp.). No caso de *Cucullanus minutus*, as larvas são importantes porque invadem a parede do intestino, especialmente a submucosa e produzem inflamação, necrose e destruição de capilares. Moravec et al. (1993), em revisão das espécies de nematóides coletados de peixes no Rio Paraná, registraram *Cucullanus pinnai* no intestino do mandi *Pimelodus ornatus*, do armado *Pterodoras granulosus* e do armadinho *Thrachydoras paraguayensis*. Também registraram *Cucullanus pseudoplatystomae* parasitando intestino de *P. corruscans*.

Philometra obturans é um nematóide encontrado encistado na pele, nadadeiras, ovário e cavidade de peixes causando peritonite, principalmente nos ciprinídeos, com conseqüente prejuízo na venda do peixe devido ao aspecto repugnante. Outros nematóides como *Camallanus* spp. possuem comportamento típico de desovar diretamente pelo ânus do peixe quando as fêmeas estão maduras, retornando posteriormente para o tubo digestório do animal. Fêmeas de *Camallanus caudatus* encontradas no intestino de peixes perfuram a porção distal do reto, atingindo a camada muscular e ficam com um terço do corpo no tecido do hospedeiro. Estas regiões, segundo Ferraz & Thatcher (1990) mostram-se hiperêmicas e com edema tecidual.

Parasitos de pacu da família Atractidae parecem não provocar danos significativos, apesar de apresentarem-se em altas infrapopulações. Martins & Urbinati (1993) e Campos (2006) relataram que nematóides da família Atractidae (*Rondonia rondoni*) são encontrados aos milhares no intestino de pacus. Quando aparecem em grande concentração de parasitas, pode levar a processos de obstrução intestinal, podendo trazer sérias consequências ao hospedeiro.

Nematóides da superfamília Dracunculoidea (*Anguillicola crassus*) são responsáveis por severas lesões na bexiga natatória de enguias jovens. A infecção segundo Haenen et al. (1994), produz inflamação no órgão.

Os helmintos de peixes têm sua importância ao longo do tempo, onde por sua ação espoliadora, irritativa ou mecânica, podem causar perda de apetite, perda de peso e aumento da susceptibilidade a outros patógenos.

Nematóides pertencentes à ordem Ascarida, subordem Ascaridina, superfamília Ascaridoidea e à família Anisakidae, composta por 24 gêneros, são causadores da anisakíase (ou anisakidose) humana.

Essa parasitose foi relatada primeiramente nos Países Baixos, em 1960, e desde então casos têm sido relatados no Japão, América do Norte, Canadá, Chile e Reino Unido, devido ao aumento na popularidade do "sushi".

As larvas (L3) dos gêneros *Anisakis, Belanisakis, Phocanema, Porrocaecum, Paradujardínia, Pseudoterranova, Cleoscaris, Phocascaris*, nos peixes, localizam-se nas serosas viscerais e podem migrar para a musculatura, onde encistam, se constituindo, quando ingeridas, em risco potencial sob o ponto de vista de Saúde Pública.

Santos et al (2002) observaram prevalência de até 70% e intensidade média de até 9,5 parasitos (larvas de *Contracaecum* sp.) no mês de setembro em *Hoplias malabaricus*. Para esses hospedeiro, a prevalência, intensidade média e abundância média de *Contracaecum* foram significativamente maiores do que as observadas em *Cichla ocellaris* e *Plagioscion squamosissimus* do rio Paraná.

Eustrongylides spp. são nematóides que podem alcançar 10 cm de comprimento, de coloração avermelhada. As aves abrigam o verme adulto no proventrículo ou fígado. Liberam ovos nas fezes, que eclodem na água, originando larvas em estágio L1, que são ingeridas por anelídeos aquáticos (*Lumbricus variegatus, Limnodrilus, Tubifex tubifex*), onde desenvolvem-se em larvas L3 infectantes. O peixe infecta-se ao ingerir o anelídeo e o parasito transforma-se em larvas L4 que permanecerão encistadas à espera que sejam ingeridas por aves. No peixe o parasito se aloja no mesentério, vísceras, musculatura ou gônadas.

Avaliando a presença de larvas de *Eustrongylides* sp. em *H. malabaricus*, *Cichla ocellaris* e *Plagioscion squamosissimus* do rio Paraná, Santos et al (2002) verificaram que não houve diferença significativa na prevalência dessas larvas nos hospedeiros examinados. Entretanto, a intensidade média e abundância média de parasitos foram maior em *H. malabaricus*.

Estes nematódeos são parasitos em um grande número de animais marinhos incluindo leões-marinhos, baleias e golfinhos. É nestes mamíferos que o parasito adulto se encontra. Os ovos embrionados são eliminados nos fezes destes mamíferos e liberam as larvas do primeiro estágio na água de mar. Estas larvas então são ingeridas por crustáceos onde se transformam em larvas L_2 e L_3. Se os peixes ingerem os crustáceos infectados, as larvas do terceiro estágio são liberadas e penetram no intestino ou no músculo desse hospedeiro. Nesse local, as larvas se encistam.

Cerca de 100 espécies de peixes podem agir como hospedeiros intermediários. Os mamíferos marinhos ingerem os peixes e o ciclo se fecha. Os seres humanos serão infectados pelas larvas do terceiro estágio ao consumirem peixes crus ou inadequadamente cozidos.

Moravec et al (1992) registraram as seguintes espécies de nematóides parasitos de peixes do Rio Paraná: *Paracapillaria piscicola* em *Salminus maxillosus* (dourado); duas espécies não identificadas da família Capillariidae em *Schizodon fasciatus* e *P. corruscans*; *Travnema travnema* em *Pseudocurimata elegans elegans*; *Travnema araujoi* e *Cosmoxynema vianai* em *Pseudocurimata gilberti gilberti*; Cosmoxynemoides aguirrei em *P. gilberti gilberti* e *P. elegans elegans*; *Ichthyouris laterifilamenta* sp. n. em *Trachydoras paraguayensis*; *I. brasiliensis* em *Pterygophchthys aculeatus*; *Brasilnema pimelodellae* em *Pimelodella lateristriga*; *Parasynodontisia petterae* em *Rhinelepts aspera*; *Rondonia rondoni* em *Pterodoras granulosus* e *T. paraguayensis.* Quanto ao número de espécies e tamanho das infrapopulações, os nematóides aparecem em segundo lugar, após os cestóides em levantamento da fauna helmíntica de peixes do Rio Paraná, região de Porto Rico (Pavanelli et al., 1997).

Malta et al. (2009) relataram ocorrência do nematóide *Spirocamallanus inopinatus* em *Brycon amazonicus* de cultivo e do Lago Catalão e Rio Solimões, no Amazonas. Machado et al. (1995, 1996) encontraram em pintados, coletados no Rio Paraná, cinco espécies de nematódeos (*Cucullanus pseudoplatystomae*, larvas de *Eustrongylides* sp., larvas de *Contracaecum* sp. 1, larvas de *Contracaecum* sp. 2 e *Procamallanus (Spirocamallanus)* sp.

No Rio Grande do Sul, em trabalho realizado por Fortes & Hoffmann (1995) foram descritas sete espécies novas de Nematoda, em peixes do Lago Guaíba: *Philometra fariaslimai*, *Porrocoecum jardimfreirei*, *Falcaustra mirandafroesi*, *Cucullanus patoi*, *C. riograndensis*, *C. fabregasi* e *C. debacoi*. Pereira Junior & Costa (1996) examinaram espécimes de *Micropogonias furnieri* com o objetivo de caracterizar o complexo de espécies da família Cucullanidae. Descreveram *Cucullanus cassinensis* sp. n. e *Dichelyne (Dichelyne) micropogoni* sp. n. e observaram *C. pulcherrimus*, *D. elongatus* e *D. (C.) amaruincai.* Fortes et al. (1999) estudaram os helmintos do cascudo-viola *Loricariichthys platymetopon* da Barragem Barbará. Examinaram 160 peixes e identificaram a espécie *Raphidascaris* (*Sprentascaris*) *malmerti* Nematoda, Anisakidae. Dos 160 peixes, 158 apresentaram *Raphidascaris* (*Sprentascaris*) *malmerti* e o número máximo de parasitos encontrados por peixe foi de 140.

C - Filo Acanthocephala

Os acantocéfalos são helmintos, parasitas, cilíndricos, com uma probóscide, retrátil, portadora de ganchos, que os adultos utilizam para fixar-se na parede do intestino do hospedeiro (Figura 10). Quanto a relação parasito-hospedeiro, este grupo de endoparasito é considerado, como uma grave ameaça para o desenvolvimento dos peixes, tanto na natureza como nas explorações industriais.

Figura 10. Acantocéfalos *Neoechinorhynchus* sp. de *Colossoma macropomum*. (**A**) Indivíduos livres. (**B**) Intestino com infestação massiva. (**C**) Espécimes aderidos à parede intestinal.

As condições de criação intensiva favorecem o parasitismo massivo, causando em certos casos, graves consequências aos hospedeiros, devido aos ganchos cefálicos do parasito provocar hemorragias e grandes lesões por necrose da mucosa intestinal.

Thatcher (1980) descreveu o acantocéfalo *Rhadinorhynchus plagioscionis* n. sp. no intestino de corvina *Plagioscion squamosissimus*, obtida em Manaus, AM. Outras espécies de acantocéfalos amazônicos também já foram descritas por Schimidt & Hughins (1973), como *Quadrigyrus nickoli* sp. n.; *Q. torquatus*, *Paliolisentis polyonca* sp. n., *Neoechinorhynchus buttnerae*, *Neoechinorhynchus* spp.; *Gorytocephalus plecostomorum*, *Octospiniferoides australis* sp. n. e *Octospiniferoides incógnita* sp. n. Malta et al. (2009) descreveram em *B. amazonicus*, cultivado no estado do Amazonas, a ocorrência de *Echinorhynchus* sp.

Brasil-Sato & Pavanelli (1999) fizeram o primeiro registro de acantocéfalo *Noechinorhynchus pimelodi* para o mandi-amarelo *Pimelodus maculatus* do rio São Francisco e registraram uma prevalência de infecção de 39,33%.

Machado et al. (1995, 1996) descreveram a estrutura, diversidade e influência do sexo e tamanho na infrapopulação de pintado e traíra no Rio Paraná e encontraram duas espécies de acantocéfalos em traíras

Octospiniferoides incognita e *Echinorhynchus* sp. Guidelli et al. (2003) observaram *Quadrigyrus machadoi* na cavidade visceral e intestino de *Hemisorubim platyrhynchos* do Rio Paraná.

Levantamentos de parasitos, realizados na Bacia do Paraná – Paraguai, por vários autores, em épocas diversas (Travassos & Kohn, 1965; Godoy, 1975; Kohn et al., 1985 Kohn & Fernandes, 1987; Oliveira & Ceccarelli, 1988) não registraram a presença de acantocéfalos no pacu *P. mesopotamicus*. Contudo, Hamann (1982), citado pelos mesmos autores, refere-se a esse peixe como um hospedeiro para a espécie de acantocéfalo *Echinorhynchus jucundus*. Campos (2006) também relata ter observado exemplares de acantocéfalo *Echinorhynchus jucundus* no intestino de pacus capturados no Rio Aquidauana (MS).

Segundo Pérez (1999), em espécies de peixes como o pacu e o piauçu são freqüentes o encontro destes parasitos na luz intestinal. Quando a infestação é alta podem ser observados inclusive no estômago dos peixes.

Doenças causadas por crustáceos

A - Lerneose

É uma famosa parasitose causada por crustáceos copépodos do gênero *Lernaea spp.*, ectoparasitos de peixes e girinos chegando a medir 12 mm de comprimento (Figura 11). *L. cyprinacea* é de origem exótica, suspeitando-se que esta espécie teria sido importada juntamente com carpas húngaras e disseminou-se no ambiente aquático brasileiro, a partir das criações.

As formas imaturas que passam por vários estágios de desenvolvimento (fase planctônica) transformam-se em copepoditos com forma típica de um copépodo e desde o estágio de primeiro copepodito já procura um novo hospedeiro para fixar-se na pele ou brânquias. A partir do estágio de copepodito VI estão prontos para cópula, o macho fecunda a fêmea e morre. A fêmea fixa-se no peixe e dá início ao crescimento dos processos cefálicos junto ao epitélio da superfície do corpo ou brânquias do animal (Kabata & Cousens, 1972). A partir daí o parasito toma uma forma atípica, alongada e com cabeça em forma de âncora. Crescem os sacos ovígeros e o ciclo se reinicia. São próprios de peixes de água doce e de pouca especificidade parasitária. São mais frequentes infestações na primavera e verão. No outono e inverno, observa-se que são mais frequentes as formas imaturas, de copepodito, sobre o peixe ou nas brânquias. No hospedeiro, localizam-se sobre a superfície do corpo, brânquias, nadadeiras, boca e, às vezes, nos órgãos internos.
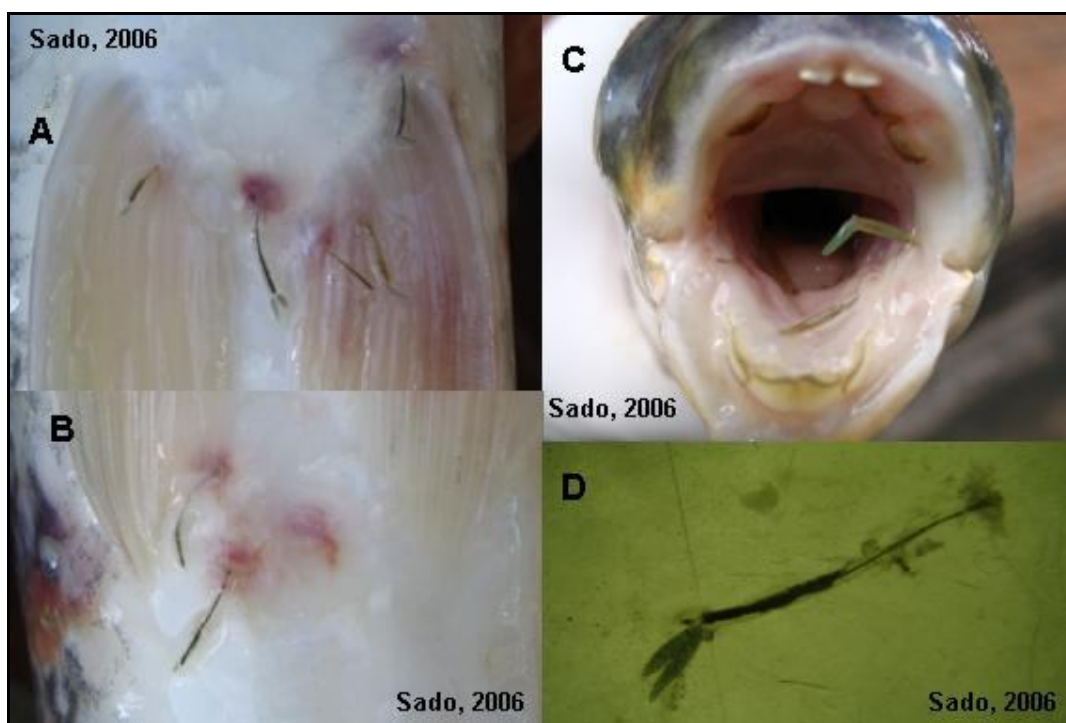
Figura 11. *Lernaea* sp. infestação em epitélio ventral (**A-B**), na região bucal (**C**) e espécime livre (**D**).

Sinais clínicos

Os peixes parasitados mostram-se apáticos, com anorexia e hemorragias puntiformes no corpo. Perdem o senso de direção e chocam-se contra as paredes do tanque, realizam subidas à superfície da água, podendo aglomerar-se nos vertedouros do tanque. Os peixes jovens são fortemente afetados, emagrecem, as brânquias tornam-se hemorrágicas e morrem quando não submetidos a tratamento. Em animais adultos, o parasito pode comprometer a reprodução e o sistema respiratório, originando infecções secundárias.

Patogenia

Onde os processos cefálicos crescem, observa-se inflamação e nódulos fibrinosos (Pellitero, 1988). Algumas vezes a cabeça do parasito pode alcançar um órgão interno como cérebro, fígado ou rim. Juntamente com monogenéticos, causam grandes perdas em criações.

Em infestação experimental, Ceccarelli (1988) observou que carpa capim, matrinxã, carpa comum e lambari apresentaram-se mais susceptíveis à *Lernaea* spp. Após 25 dias em água a 23,7^{o}C, alevinos de pacu

apresentaram o parasito adulto. O ciclo de vida depende também da temperatura, sendo que em temperaturas inferiores a 15°C não se completa o ciclo. Martins & Souza Junior (1995) em infestação experimental de copepoditos de *L. cyprinacea* em girinos de rã, revelaram os parasitos adultos após 72 horas. Em altas infestações, torna-se difícil o tratamento, devido à resistência do parasito. Tais infestações com 3 a 4 parasitos adultos por cm^2 no corpo do peixe, não são tão freqüentes, mas a melhor forma de se controlar a doença é a prevenção e acompanhamento da criação para que a doença não evolua.

B - Lamproglenose

Esta doença, relativamente nova no Brasil, é provocada por crustáceos da mesma família da *Lernaea*, pertencentes ao gênero *Lamproglena*. De menores dimensões quando comparados aos primeiros, são visíveis a olho nu ou com uma simples lupa. São encontrados fixados aos filamentos branquiais em vários estágios de desenvolvimento, inclusive portando sacos ovígeros. As formas larvais são semelhantes a copepoditos de *Lernaea*, porém com o desenvolvimento a região anterior transforma-se em uma estrutura que, à primeira vista lembra o início da formação de "âncora" dos parasitos do gênero *Lernaea*. Através desta região, fixam-se fortemente nos filamentos branquiais e por vezes nos rastros branquiais (Figura 12).
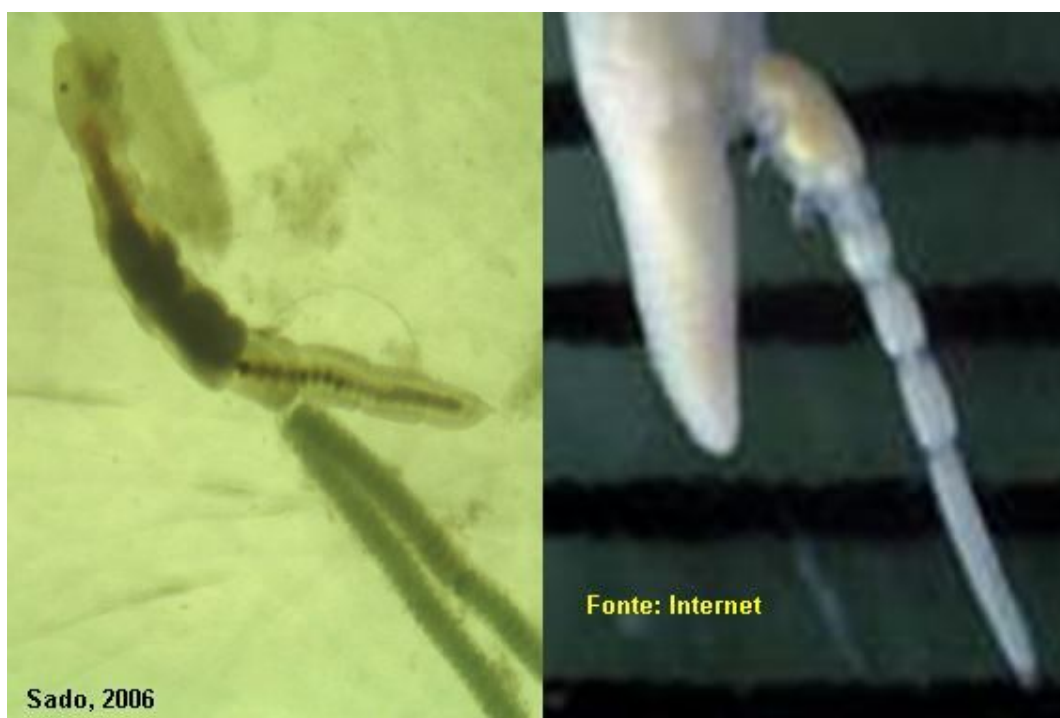
Figura 12. *Lamproglena* sp. aderidas a filamento branquial.

Geralmente assintomático, porém quando em alta infestação os peixes páram de se alimentar, podendo-se observar os parasitos macroscopicamente nas brânquias. Os peixes ficam apáticos, podendo se aglomerar na entrada da água. Em infestações massivas ocorre a morte do peixe.

Patogenia

Pelo seu tamanho avantajado, pode provocar sérias consequências no sistema de circulação branquial e na respiração dos peixes. Hiperplasia e hipertofia das lamelas com consequente hemorragia podem ser portas de entrada para outras infecções secundárias, cujos patógenos podem estar presentes no ambiente aquático.

C - Ergasilose

O responsável pela doença chamada ergasilose, é outro crustáceo copépodo, do gênero *Ergasilus*. Provido de antenas modificadas em ganchos para fixação no hospedeiro, os ergasilídeos podem ser encontrados vivendo no plâncton e medem aproximadamente 880 µm (Figura 13). O ciclo de vida é semelhante ao dos demais copépodes. Localizam-se preferivelmente nas brânquias e narinas dos peixes.

Não se tem observado grandes perdas em criações por estes crustáceos, na região Sudeste e Sul do Brasil. São mais comuns em pisciculturas da Amazônia. Em pisciculturas no estado do Amazonas, o *Ergasilus bryconis* tem sido documentado parasitando matrinxã *Brycon amazonicus* (Malta et al., 2009).

Sinais clínicos

Quando a infestação é intensa (100 a 1000 parasitos) observa-se estrutura branca quando se levanta o opérculo do hospedeiro. Assim como a lamproglenose, a fixação dos parasitos nas brânquias traz consequências de asfixia e também a possibilidade de infecções secundárias por fungos e bactérias.

Patogenia

Os ganchos, seu aparelho de fixação, penetram nos filamentos branquiais podendo provocar infiltração de células, hiperplasia epitelial, fusão de lamelas e até destruição e ruptura de vasos sanguíneos (Thatcher & Boeger, 1983). Nas brânquias de *B. amazonicus*, a presença de *E. bryconis* provoca infiltração, hiperplasia epitelial, metaplasia epitelial, transformação de células epiteliais em células mucosas e, consequentemente, a fusão das lamelas (Malta et al., 2009).
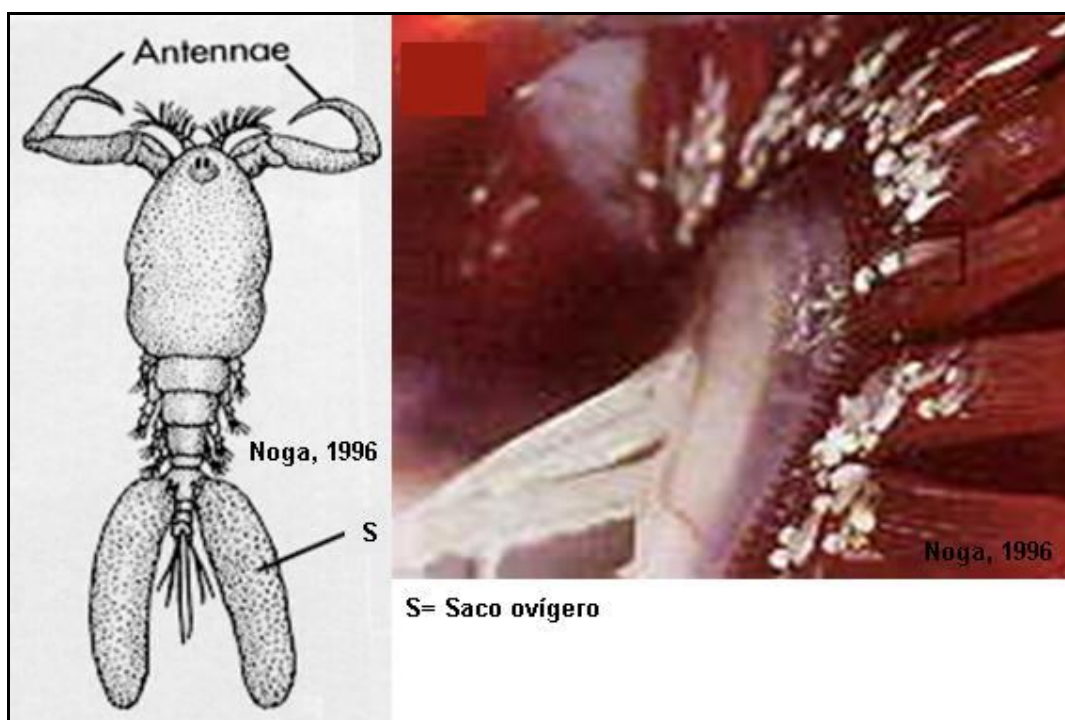
Figura 13. Ilustração de infestação por *Ergasilus* sp. nas brânquias.

D - Argulose

Pertencendo à subclasse Branchiura, *Argulus* spp. e *Dolops* spp. são os ectoparasitos responsáveis pela argulose, ou doença dos carrapatos. De forma foliácea, achatados, de até 15 mm de comprimento, providos de órgãos de fixação no hospedeiro, que podem ser ventosas, no gênero *Argulus*, ou ganchos, no caso de *Dolops* (Figura 14). São de baixa especificidade parasitária. As fêmeas copulam, saem do peixe parasitado para colocar os ovos em substrato submerso como plantas e folhas no fundo ou borda do tanque onde desenvolverão as formas imaturas semelhantes à mãe, que imediatamente procuram um hospedeiro e iniciam o ciclo. A reprodução ocorre de abril a setembro, podendo variar de acordo com a temperatura, sendo no ano inteiro quando em clima favorável. No hospedeiro, localizam-se em geral na superfície do corpo, nadadeiras e cavidade branquial.

Possui baixa especificidade parasitária, podendo ser encontrado parasitando tanto espécies de couro como de escamas, inclusive o tambaqui *C. macropomum* (Malta & Varella, 1983). Atualmente, *Dolops carvalhoi* é a espécie de argulídeo que mais está disseminada no Estado de São Paulo. Especula-se que este parasito tenha sido introduzido em águas desta região por meio da introdução de matrizes de tambaquis amazônicos nas

pisciculturas sem a realização de medidas sanitárias efetivas. A sua ampla ocorrência na Região Sudeste provavelmente deve-se à sua grande adaptação ao mais variados ambientes, aliado à sua baixa especificidade parasitária (Onaka, 2005).

Figura 14. *Dolops carvalhoi,* infestação no epitélio.

Sinais clínicos

Os peixes parasitados mostram-se agitados, parecendo querer retirar algo do corpo. Raspam-se contra as paredes do tanque ou o substrato. Hemorragias puntiformes são freqüentes e ocorre secreção de muco na superfície da pele e brânquias.

Patogenia

As hemorragias podem evoluir para lesões de maior tamanho com a conseqüente invasão bacteriana e fúngica. Estes parasitos são responsáveis por transportar viroses e bacterioses de importância na piscicultura. As brânquias tornam-se hemorrágicas e hiperplásicas podendo ocorrer necrose.

Temos observado que causam tanto dano quanto a *Lernaea* porque mudam muito de local num mesmo peixe para picar e se alimentar de células epiteliais e mucosas, quando liberam toxinas que causam degeneração linfocítica.

Todos os crustáceos parasitos podem causar danos nas brânquias, principalmente na fase de copepodito, quando se movimentam muito no corpo do hospedeiro (Martins & Souza Junior, 1995). Com isto as brânquias têm sua função respiratória diminuída pela ação alimentar dos parasitos e sua fixação. *Argulus* sp pode causar lesões oculares devido à fixação no globo ocular, provocando lesões superficiais que são agravadas por infecções secundárias por fungos e bactérias. Parasitoses por crustáceos freqüentemente provocam perda de peso nos peixes.

Considerações finais

Com o avanço da piscicultura no Brasil, a partir da década de 80, surgiram novas técnicas de criação e também alternativas quanto às espécies de peixes a serem cultivadas. Com a criação de empreendimentos do tipo pesque-pague, em algumas regiões, houve um aumento do número de pisciculturas e a intensificação das criações. O transporte de peixes do ambiente natural para o cativeiro ou entre diferentes criatórios é fator estressante, devido ao manejo de captura e ao próprio transporte, que muitas vezes é feito em condições de superpopulação ou aeração inadequada. Aliado ao fato de que os peixes são comprados de diferentes fornecedores e transportados em grandes densidades de estocagem, há o risco real de disseminação de doenças entre diferentes propriedades. Desse modo, se por um lado há aumento do número de criações de peixes, por outro há aumento da ocorrência de enfermidades, com sérios prejuízos aos criadores.

Referências

ANDERSON, R. C.; CHABAUD, A. G.; WILLMOTT, S. 1974. *CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates*. England: Commonwealth Agricultural Bureaux.

BÉKÉSI, L. 1992. Evaluation of data on ichthyopathologic analyses in the brazilian northern. *Ciência e Cultura*, 44: 400-403.

BOEGER, W. A.; HUSAK, W. S.; MARTINS, M. L. 1995. Neotropical Monogenoidea. 25. *Anacanthorus penilabiatus* n. sp. (Dactylogyridae, Anacanthorinae) from *Piaractus mesopotamicus* (Ostheichthyes, Serrasalmidae), cultivated in the State of São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 90:699-701.

BOEGER, W. A.; POPAZOGLO, F. 1995. Neotropical Monogenoidea. 23. Two new species of Gyrodactylus (Gyrodactylidae) from a Cichlid and na Erythrinid Fish of Southeastern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 90:689-694.

BRASIL-SATO, M. C.; PAVANELLI, G. C. 1999. Ecological and reproductive aspects of *Neoechinorhynchus pimelodi* Brasil-Sato & Pavanelli (Eoacanthocephala, Neoechinorhynchidae) of *Pimelodus maculatus*

Lacépède (Siluroidei, Pimelodidae) of the São Francisco river, Brazil. *Rev. Bras. Zool.*, 16:73-82.

BUCHMANN, K. 1987. The effects of praziquantel on the monogenean gill parasite *Pseudodactylogyrus bini*. *Acta Vet. Scandinavica*, 28:447-450.

BUCHMANN, K.; KOIE, M.; PRENTO, P. 1987. The nutrition of the gill parasitic monogenean *Pseudodactylogyrus anguillae. Parasitol. Res.*, 73:532-537.

BUCHMANN, K.; BJERREGAARD, J. 1990. Comparative eficacies of commercially available benzimidazoles against *Pseudodactylogyrus* infestations in eels. *Dis. Aquatic Org*, 9:117-120.

CAMPOS, C. F. M. 2006. *Fauna parasitária e alterações teciduais em três espécies de peixes dos rios Aquidauana e Miranda, Pantanal Sul Mato-Grossense*. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal.

CAMPOS, C. F. M.; TOMBINI, A. A. M.; FONSECA, V. E.; SILVA, R.; ALMEIDA, V. F.; GONÇALVES, S.; TOMBINI, A. A. M. 2002. Parasitos, metazoários de pacu *Piaractus mesopotamicus*, cultivados em viveiro, na Bacia do Alto Paraguai, MS, Brasil. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO, 3.; ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 7., 2002, Foz do Iguaçu. *Anais...* [S.l.: s.n.], p.162.

CAMPOS, C. F. M.; FONSECA, V. E.; GIESEN, S. C.; ONAKA, E. M.; MORAES, F. R. 2004. Mixosporídeos em pacus *Piaractus mesopotamicus* capturados no rio Aquidauana, MS. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE AQÜICULTURA E BIOLOGIA AQUÁTICA, 1, Vitória, ES. *Anais...*São Paulo: TecArt.

CASTELO, F. P. 1984. Ocorrência de cistos de *Clinostomum marginatum* Rudolphi, 1819, “yellow spot disease” em filé de jaraqui (*Semaprochilodus insignis* Schomburgk, 1814). *Acta Amazonica*, 13: 325-326.

CECCARELLI, P. S. 1988 Susceptibilidade à infestação de *Lernaea* (Copepoda: Lernaeidae) Linnaeus em diferentes espécies de peixes cultivados no CEPTA e testes de infestação no pacu *Piaractus mesopotamicus* em laboratório. *Bol. Téc. CEPTA*, 1:31-35.

CECCARELLI, P. S.; FIGUEIRA, L. B.; LIMA, C. L. B. F. de; OLIVEIRA, C. A. 1990. Observações sobre a ocorrência de parasitas em no CEPTA entre 1983 e 1990. *Bol. Téc. CEPTA*, 3:43-54.

CONROY, G. A. 1987. *Curso de Ampliación de Conocimientos sobre Ictiopatologia.* Venezuela: Organización de las Naciones Unidas para Agricultura y la Alimentación.

EIRAS, J. C. 1994. *Elementos de ictioparasitologia*. Porto, Portugal: Fundação Eng. Antônio de Almeida, 339 p.

EIRAS J. C.; REGO A. A. 1989. Histopatologia em peixes resultante de infecções parasitárias. *Publ. Inst. Zool. Dr. Augusto Nobre,* Portugal , 208:1-11.

EVANS, R. S.; HECKERMANN, R. A.; PALMIERI, J. R. 1976. Diplostomatosis in Utah. *Proc. Utah Acad. Sc.*, 53:23-25.

EWING, M. S.; KOCAN, K. M. 1988. *Ichthyophthirius* (Ciliophora): population studies suggest reproduction in host epithelium. *J. Protozool.*, 35:549-552.

EWING, M. S.; KOCAN, K. M.; EWING, S. A. 1985. *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) invasion of gill epithelium. *J. Protozool.*, 32:305-310.

FERRAZ, E.; THATCHER, V. E. 1990. *Camallanus acaudatus* sp. n. (Nematoda: Camallanidae) é uma descrição do macho de *Camallanus*

tridentatus (D., 1884) parasitas de peixes da Amazônia Brasileira. *Amazoniana*, 11:135-145.

FIGUEIRA, L. B.; CECCARELLI, P. S. 1991. Observações sobre a presença de ectoparasitas em pisciculturas tropicais de interior (CEPTA e REGIÃO). *Bol. Téc. CEPTA*, 4:57-65.

FORTES, E.; HOFFMANN, R. P. 1995. Levantamento da fauna parasitária de peixes do Lago Guaíba, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. Bras. Med. Vet*., 17:107-111.

FORTES, E.; HOFFMANN, R. P.; QUEROL, M. V. M. 1999. Presença de *Raphidascaris (Sprentascaris) mahnerti* (Pettet Et Cassone, 1984) Nematoda, Anisakidae em *Loricariichthys platymetopon* (cascudo viola), da Bacia do Rio Uruguai Médio, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. Bras. Med. Vet*., 21:13-14.

FORTES, E.; HOFFMANN, R. P.; SCARIOT, J. 1996. Trematódeos digenéticos de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) do lago Guaíba, Porto Alegre, RS, Brasil. *Rev. Bras. Med. Vet*., 8:230-248.

FUJIMOTO, R. Y.; NAKAMURA, M.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. 2002. Avaliação da fauna parasitária de helmintos monogenéticos em juvenis de pacus (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887) suplementados com cromo na dieta e submetidos a duas densidades de estocagem. 1. Resultados preliminares. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO, 3.; ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 7., 2002, Foz do Iguaçu. *Anais*... [S.l.: s.n.], p.73.

GARCIA, F.; FUJIMOTO, R.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. 2002. Identificação de *Urocleidoides* SP (Helmintos Monogenóides) em *Xiphophorus* sp de uma piscicultura de peixes ornamentais do município de Araraquara, São Paulo, Brasil. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO, 3.; ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 7., 2002, Foz do Iguaçu. *Anais*... [S.l.: s.n.], p.141.

GODOY, M. P. 1975. Peixes do Brasil: subordem Characoidei da Bacia do Rio Mogi Guassu. Piracicaba: Editora Franciscana:p. 2-4.

GUIDELLI, G. M.; ISAAC, A.; PAVANELLI, G. C. 2002. *Sanguinicola platyrhynchi* n. sp. (Digenea: Sanguinicolidae) parasite in visceral cavity of *Hemisorubim platyrhynchos* (Valenciennes, 1840) (Pisces: Pimelodidae) from the floodplain of the Upper Paraná River, Brazil. *Rev. Bras. Biol.*, 62:801-806.

GUIDELLI, G. M.; ISAAC, A.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. 2003. Endoparasite infracommunities of *Hemisorubim platyrhynchos* (Valenciennes, 1840) (Pisces: Pimelodidae) of the baía river, upper Paraná river floodplain, Brazil: specific composition and ecological aspects. *Braz. J. Biol*., 63:261-268.

HAENEN, O. L. M.; VAN BANNING, P.; DEKKER, W. 1994. Infection of eel *Anguilla anguilla* (L.) and smelt *Osmerus eperlanus* (L.) with *Anguillicola crassus* (Nematoda, Dracunculoidea) in the Netherlands from 1986–1992. *Aquaculture*, 126:219–229.

HAMANN, M. I. 1982. Parasítos del pacu (*Colossoma mitrei*) del rio Paraná médio, Republica Argentina (pisces, Serrasalmidae). *Historia Natural*, Corrientes, 2:153-160.

HOFFMANN, R. W.; MEDER, J.; KLEIN, M.; OSTERKORNJ, K.; NEGELE R.D. 1986. Studies on lesions caused by plerocercoids of *Triaenophorus*

nodulosmin some fish of an alpine lake, the Königssee *Journal of Fish Biology* 28(6):701 – 712.

JOYON, L.; LOM, J. 1969. Etude cytologique, sistématique et pathologique d'Ichthyobodo necator (Henneguy, 1883) Pinto, 1928 (Zooflagelle). *J. Protozool*, 16:703-719.

KABATA, Z.; COUSENS, B. 1972. The structure of the attachment organ of lernaeopodidae (Crustacea: Copepoda). *J. Fish Res. Bd. Canada*, 29: 1015-1023.

KINKELIN, P.; MICHEL, C.; GHITTINO, P. 1991. *Tratado de las Enfermedades de los Peces*. Zaragoza, España: Editora Acribia.

KOHN, A.; FERNANDES, B. M. M.; Macedo, B.; Abramson, B. 1985. Helminths parasites of freshwater fishes from Pirassununga, SP, Brazil. *Mem. Instit. Oswaldo Cruz* 80(3):327-336.

KOHN, A.; FERNANDES, B. M. M. 1987. Estudo comparativo dos helmintos parasitos de peixes do rio Mogi Guassu, coletados nas excursões realizadas entre 1927 e 1985. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82(4):483-500.

KRITSKY, D. C.; THATCHER, V. E.; KAYTON, R. J. 1979. Neotropical monogenoidea. 2. The Anacanthorinae Price, 1967, with the proposal of four new species of *Anacanthorus* Mizelle & Price, 1965, from amazonian fishes. *Acta Amazonica*, 9:355-361.

KRITSKY, D. C.; BOEGER, W. A.; THATCHER, V. E. 1988a. Neotropical monogenea. 11. *Rhinoxenus*, new genus (Dactylogyridae: Ancyrocephalinae) with descriptions of three new species from the cavities of Amazonian characoidea. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 101:87-94.

KRITSKY, D. C.; THATCHER, V. E.; BOEGER, W. A. 1988b. Neotropical monogenea. 13. *Rhinonastes pseudocapsaloideum* n. gen., n. sp. (Dactylogyriadae, Ancyrocephalinae), a nasal parasite of curimatã, *Prochilodus nigricans* Agassiz (Cypriniformes, Prochilondotidae), in Brazil. *J. Parasitol.*, 74:695-698.

KUROSVSKAYA, L. N.; OSADCHAYA, S. A. 1993. The influence of *Ichthyophthrius multifiliis* on underyearling carp, *Cyprinus carpio*. *J. Ichthyol*., 33:81-92.

LOM, J. 1973. The adhesive disc of *Trichodinella epizootica.* Ultrastructure and injury to the host tissue. *Folia Parasitol.*, 20:193-202.

MACHADO, M. H.; PAVANELLI, G. C.; TAKEMOTO, R. M. 1995. Influence of type of environment and of the hydrological level variation in endoparasitic infrapopulations of *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz) and *Schizodon borelli* (Boulenger) (Osteichthyes) of the high Paraná river, Brazil. *Revta Brasil. Zool.*, 12:961-976.

MACHADO, M. H.; PAVANELLI, G. C.; TAKEMOTO, R. M. 1996. Structure and diversity of endoparasitic infracommunities and the trophic level of *Pseudoplatystoma corruscans* and *Schizodon borelli* (Osteichthyes) of the high Paraná river. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 91:441-448.

MALTA, J. C. O.; VARELLA, A. 1983. Os argulídeos (Crustacea: Branchiura) da Amazônia brasileira 3. Aspectos da ecologia de *Dolops striata* Bouvier, 1899 e *Dolops carvalhoi* Castro, 1949. *Acta Amazonica*, 13:299-306.

MALTA, J. C. O.; ANDRADE, S. M. S.; AQUINO-PEREIRA, S. L.; TAVARES-DIAS, M.; VARELLA, A. M. B. 2009. Parasitos do matrinxã *Brycon amazonicus* Spix & Agassiz, 1829 (Characidae: Bryconinae) na Amazônia

central. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá, p. 425-437.

MARKIW, M. E.; WOLF, K. 1983. *Myxosoma cerebralis (*Myxosoa:Myxosporea) etiologic agent of salmonid whriling disease requires tubificid worm (Annelida: Oligochaeta) in its life cycle. *J. Protozool.*, 30:561-564.

MARTINS, M. L.; ROMERO, N. G. 1996. Efectos del parasitismo sobre el tejido branquial en peces cultivados: estudio parasitologico e histopatologico. *Rev. Bras. Biol*., 13:489-500.

MARTINS, M. L.; URBINATI, E. C. 1993. *Rondonia rondoni* Travassos, 1919 (Nematoda: Atractidae) parasite of *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). *Ars Veterinária*, 9:75-81.

MARTINS, M. L.; SOUZA JUNIOR, F. L. 1995. Infestação experimental em girinos de *Rana catesbeiana* Shaw, 1802 por copepoditos de *Lernaea cyprinacea* Linnaeus, 1758 (Copepoda: Lernaeidae). *Rev. Bras. Zool.*, 12:619-625.

MARTINS, M. L.; SOUZA, V. N.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E.; COSTA, A. J. 1995. Surto de mixosporidiose em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887. Características comportamentais, anátomopatológicas e patogenicidade. In: SEMANA SOBRE HISTOLOGIA DE PEIXES, 6., 1995, Jaboticabal. *Anais...* Jaboticabal: FCAV-Unesp.

MARTINS, M. L.; FUJIMOTO, R. Y.; NASCIMENTO, A. A.; MORAES, F. R. 1999. Ocorência de *Diplostomum* sp. Nordmann, 1832 (Digenea: Diplostomidae) em *Plagioscion squamosissimus* Heckel, 1840 proveniente do reservatório de Volta Grande, MG, Brasil. *Acta Scientiarum*, 21:263-266.

MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; FUJIMOTO, R. Y.; ONAKA, E. M.; SCHALCH, S. H. C.; SILVA, E. D.; NOMURA, D. T.; SILVA, C. A. H. 2000. Parasitic infections in cultivated brazilian freshwater fishes. A survey of diagnosticated cases from 1993 to 1998. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 9:23-28.

MARTINS, M. L.; ONAKA, E. M.; MORAES, F. R.; BOZZO, F. R.; PAIVA, A. M. F. C.; GONÇALVES, A. 2002. Recent studies on parasitic infections of freshwater fish in the State of São Paulo, Brazil. *Acta Scientiarum*, 24:981-985.

MELLERGAARD, S.; DALSGAARD, I. 1987. Disease problems in Danish eel farms. *Aquaculture,* 67:139-146.

MERLINI, L. S.; FARIA, R. H. S.; VARGAS, L.; TONINATO, J. C.; RIBEIRO, R. P.; MOREIRA, H. L. M. 2002. Ocorrência Sazonal de ectoparasitas em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em um pesque e pague de Umuarama-PR. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO, 3.; ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 7., 2002, Foz do Iguaçu. *Anais...* [S.l.: s.n.], p. 92.

MIYAZAKI, T.; ROGER, W. A.; PLUMB, J. A. 1986. Histopathological studies on parasitic protozoan diseases of the channel catfish in the United States. *Bull. Fac. Fish. Mie Univ.*, 13:1-9.

MORAES, F. R.; MARTINS, L. M.; ONAKA, E. M.; CASTAGNOLLI, K. C.; NOMURA, D. T.; FUJIMOTO, R. Y. 1999. Eficácia de diflubenzuron, levamisole e mebendazole contra helmintos monogenóides parasitos de brânquias de carpas *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758. In: In: SEMINARIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINARIA, 11.; SEMINARIO DE PARASITOLOGIA VETERINARIA DOS PAISES DO MERCOSUL, 2.; SIMPÓSIO

DE CONTROLE INTEGRADO DE PARASITOS DE BOVINOS, 1., 1999, Salvador. *Anais...* Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, p. 186.

MORAVEC, F.; KOHN, A.; FERNANDES, B. M. M. 1992. Nematode parasites of fishes of the Paraná River, Brazil. Part 1. Trichuroidea, Oxyuroidea and Cosmocercoidea. *Folia Parasitol.*, 39:327-353.

NOGA, E. J. 1996. *Fish Disease. Diagnosis and Treatment*. St Louis, Missouri: Mosby-Year Book, 367 p.

NOGA, E. J.; FLOWERS, J. R. 1995. Invasion of *Tilapia mossambica* (Cichlidae) viscera by the monogenea *Enterogyrus cichlidarum*. *J. Parasitol.*, 81:815-817.

OLIVEIRA, C. A.; CECCARELLI, P. S. 1988. Sanidade, patologia e controle de enfermidades. *Red. Acuic. Bol.* 1(2):13.

ONAKA, E. M. 2001. *Eficácia do mebendazol e do levamisol no controle de parasitos monogenóides e eventuais alterações no hemograma de pacu, Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887 (Osteichthyes:Characidae)*. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal.

ONAKA, E. M. 2005. *Infestação experimental por Dolops carvalhoi (Crustacea:Branchiura) em peixes tropicais e seu controle com diflubenzuron na ração*. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal.

ONAKA, E. M.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. 2003. Eficácia do albendazol e praziquantel no controle de Anacanthorus penilabiatus (Monogenea: Dactylogyridae), parasito de pacu Piaractus mesopotamicus (Osteichthyes: Characidae). I. Banhos terapêuticos. *B. Inst. Pesca*, 29:101-107.

PAMPLONA-BASILIO, M. C.; KOHN, A. 2001. New host records and description of the egg of *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea, Dactylogyridae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96:667-668.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. 2002. *Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. 2. ed. Maringá: EDUEM: NUPÉLIA, 305p.

PAVANELLI, G. C.; MACHADO, M. H.; TAKEMOTO, R. M. 1997. Fauna helmíntica de peixes do rio Paraná, região de Porto Rico, Paraná. In: VAZZOLER, A. E. A. M.; AGOSTINHO, A. A. *A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*. Maringá: EDUEM, Cap. II.

PAVANELLI, G. C.; TAKEMOTO, R. M. 1995. New species of Proteocephalus (Cestoda: Proteocephalidae) parasitic in fishes from the Paraná River, Paraná, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 90:593-596.

PELLITERO, P. A. 1988. *Enfermedades producidas por parasitos. en peces***.** In: CAYCIT. Patologia en Acuicultura: Plan de Formacón de Técnicos en Acuicultura. Madrid, p. 215-326.

PEREIRA JUNIOR, J.; COSTA, M. A. S. 1996. Cucullanidae (Nematoda: Seratoidea) em *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) (Sciaenidae) do Rio Grande do Sul, com descrição de *Cucullanus cassinensis* sp. n. e *Dichelyne* (Dichelyne) *micropogonii* sp. n.. *Comum. Mus. Ciên. Tecnol. (PUC/RS)* 9: 11-30.

PEREIRA, JUNIOR, J.; VIANA, R. T. 1998. Ocorrência Sazonal de *Gyrodactylidae* em *Corydoras paleatus* Jenyns, 1842 (Callichthyidae) em

função da temperatura. In: SEMANA NACIONAL DE OCEANOGRAFIA, 11., 1998, Rio Grande, RS. *Resumos Expandidos*. Pelotas: UFPel.

PÉREZ, A. C. A. 1999. Empreendimentos piscícolas e o médico veterinário. *Revista de Educação Continuada do CRMV-SP*, São Paulo, v. 2, fascículo 2, p. 043-065.

POPAZOGLO, F. 1997. *Monogenoidea Platyhelminthes de Corydoras spp. (Siluriformes, Callichthyidae) e avaliação da sua utilidade na discriminação de espécies simpátricas de seus hospedeiros*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

POST, G. 1987. *Textbook of Fish Health*. New Jersey: TFH publ.

PRIETO, A.; FAJER, E.; VINJOY, M.; MARTÍNEZ, M. 1994. *Parasites of freshwater cultured fish. Differencial diagnostic Keys.* Mexico: FAO/Aquila: II Project.

REGO, A. A.; MACHADO, P. M.; PAVANELLI, G. C. 1999. *Sciadocephalus megalodiscus* Diesing, 1850 (Cestoda: Corallobothriinae), a parasite of *Cichla monoculus* Spix, 1831 (Cichlidae), in the Paraná River, State of Paraná, Brazil. *J. Helminthol. Soc. Wash.*, 66:133-137.

REGO, A. A.; PAVANELLI, G. C. 1987. Cestóides proteocefalídeos do jaú, *Paulicea luetkeni*, peixe pimelodídeo do Brasil. *Rev. Brasil. Biol*., 47:357-361.

REICHENBACH-KLINKE, H.-H. 1982. *Enfermedades de los Peces*. Zaragoza, España: Editora Acribia.

ROBERTS, R. J. 1981. *Patologia de los Peces*. Madrid: Mundi-Prensa.

ROGERS, W. A.; GAINES, J. L. 1975. Lesions of protozoan diseases in fish. In: RIBELIN, W. E.; MIGAKI, G. *Pathology of Fishes*. Madison: Wisconsin Press, p. 117-141.

ROGERS, W. A.; PLUMB, J. A.; JEZEK, D. A. 1983. Effect of the eye fluke on the growth and survival of the channel catfish. *Highlights Agric. Res*., 30:20.

SANTOS, R. S.; MARTINS, M. L.; MARANGONI, N. G.; TAKAHASHI, H. K.; ONAKA, E. M. 2002. Ocorrência de larvas de *Contracaecum* sp. (Nematoda: anisakidae) em três espécies de peixes do rio Paraná, Presidente Epitácio, SP, Brasil. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO, 3.; ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 7., 2002, Foz do Iguaçu. *Anais...* [S.l.: s.n.], p.138.

SANTOS, R. S.; MARTINS, M. L.; TAKAHASHI, H. K.; MARANGONI, N. G.; FUJIMOTO, R. Y. 2002. Ocorrência de larvas de Eustrongylides sp. (Nematoda:diotophymatidae) em três espécies de peixes do rio Paraná, Presidente Epitácio, SP, Brasil. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO, 3.; ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 7., 2002, Foz do Iguaçu. *Anais...* [S.l.: s.n.], p.139.

SARAIVA, A.; EIRAS, J.; CRUZ, C.; SANTOS, M. J. 2002. Diagnóstico de doenças de peixes. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO, 3.; ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 7., 2002, Foz do Iguaçu. *Anais...* [S.l.: s.n.], p 13.

SCHÄFFER, G. V.; REGO, A. A.; PAVANELLI, G. C. 1992. Peritoneal and visceral cestode larvae in brazilian freshwater fishes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 87: 257-258.

SCHALCH, S. H. C. 2002. *Apreciação da fauna ictioparasitária em pesqueiro tipo pesque-pague do município de Guariba-SP.* Dissertação (Mestrado) – Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal.

SCHIMIDT, G. D.; HUGGHINS, E. J. 1973. Acanhocephala of south american fishes. Part I, Eoacanthocephala. *J. Parasit.*, 59:829-835.

SCHMAHL, G.; MEHLHORN, H. 1985. Treatment of fish parasites: **1**. Praziquantel effective against Monogenea (*Dactylogyrus vastator, Dactylogyrus extensus, Diplozoon paradoxum*). *Z. Parasitenkd*, 71:727-737.

SCHMAHL, G.; TARASCHEWSKI, H. 1987. Treatment of fish parasites: **2**. Effects of praziquantel, niclosamide, levamizole-HCl, and metrifonate on Monogenea (*Gyrodactylus aculeati, Diplozoon paradoxum*). *Parasitol. Res.*, 73:341-351.

SCHOLZ, T.; CHAMBRIER, A.; PROUZA, A.; ROYERO, R. 1996. Redescription of *Proteocephalus macrophallus*, a parasite of *Cichla ocellaris* (Pisces: Cichlidae) from south America. *Folia Parasitol.*, 43:287-291.

SIN, Y. M.; LING, K. H.; LAM, T. J. 1994. Passive transfer of protective immunity against ichthyophthiriasis from vaccinated mother to fry in tilapias, *Oreochromis aureus*. *Aquaculture*, 120:229–237.

SOUZA, M. L. R.; MARTINS, M. L.; SANTOS, J. M. 2000. Microscopia eletrônica de varredura de parasitas branquiais de *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887, cultivados no Estado de São Paulo-SP. *Acta Scientiarum*, 22: 527-531.

SZEKÉLY, C.; MOLNAR, K. 1991. Praziquantel (Droncit) is effective against diplostomosis of grasscarp *Ctenopharyngodon idella* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Dis. Aqua. Org.*, 11:147-150.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R.; MARTINS, M. L.; KRONKA, S. N. 2001. Fauna parasitária de peixes oriundos de "pesque-pagues" do município de Franca, São Paulo, Brasil. II. Metazoários. *Rev. Bras. Zool.*, 18:81-95.

TAVARES-DIAS, M.; LEMOS, J. R. G.; ANDRADE, S. M. S.; AQUINO-PEREIRA, S. L. 2006 Ocorrência de ectoparasitos em *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Characidae) cultivados em estação de piscicultura na Amazônia Central. [S.l.]: CIVA, p. 726-731. Disponível em: http://www.civa2006.org. Acesso em:

THATCHER, V. E. 1979a. *Brasicystis benneti* n. gen., n. sp. (Trematoda: Didymozoidae) parasita de pescada (Scianidae) da Amazônia, Brasil. *Acta Amazonica*, 9:747-749.

THATCHER, V. E. 1979b. Paramphistomidae (Trematoda: Digenea) de peixes de água doce: dois novos gêneros da Colômbia e uma redescrição de *Dadaytrema oxycephala* (Diesing, 1836) Travassos, 1934, da Amazônia. *Acta Amazonica*, 9:203-208.

THATCHER, V.E. 1980. *Rhadinorhynchus plagioscionis* sp. nov**.** (Acanthocephala:Rhadinorhynchidae) da pescada (*Plagioscion squamosissimus*) da Amazônia Brasileira. *Acta Amazonica,* 10(4):835-839.

THATCHER, V. E. 1981. Patologia de peixes da Amazônia brasileira. Aspectos gerais. *Acta Amazonica* 11:125-140.

THATCHER, V. E. 1991. Amazon fish parasites. *Amazoniana*, 11:263-572.

THATCHER, V. E.; BOEGER, W. A. 1983. The parasitic crustaceans of fishes from the brazilian Amazon. 4. *Ergasilus colomesus* n.sp. (Copepoda:

Cyclopoida) from an ornamental fish, *Colomesus asellus* (Tetraodontidae) and aspects of this patogenicity. Trans. Am. Microsc. Soc. 102(4):371-379.

THATCHER, V. E.; KRITSKY, D. C. 1983. Neotropical monogenoidea.4. *Linguadactyloides brinkmanni* gen. et sp. n. (Dactylogyridae: Linguadactyloidinae) subfam. n. with observations on its pathology in a brazilian freshwater fish, *Colossoma macropomum*. *Proc. Helminthol. Soc. Wash*., 50:305-311.

THATCHER, V. E.; NETO, J. B. 1994. Diagnóstico, Prevenção e Tratamento das enfermidades de peixes neotropicais de água doce. *Rev. Brasil. Med. Vet.*, 16:111-128.

Thatcher, V. E.; Varella, A. B. 1980. A malignant tumor of the gills related to metacercaria of a trematode. *Acta Amazonica* 10:651-656.

THATCHER, V. E.; VARELLA, A. B. 1981. Duas espécies de *Megacoelium* Szidat, 1954. (Trematoda: Haploporidae), parasitos estomacais de peixes da Amazônia brasileira, com uma redefinição do gênero. *Acta Amazonica*, 11:285-289.

TOJO, J.; SANTAMARINA, M. T.; UBEIRA, F. M. 1992. Anthelmintic activity of benzimidazoles against *Gyrodactylus sp* infecting rainbow trout *Oncorrynchus mykiss. Dis. Aqua. Org.*, 12:185-189.

TRAVASSOS, L.; KOHN, A. 1965. Lista dos helmintos parasitas de peixes encontrados na Estação Experimental de Biologia e Piscicultura de Emas, Pirassununga, Estado de São Paulo. Pap. Avulsos Dep. Zool. 17(5):35-52.

VARGAS, L. 2001. Patologia de peixes. In: HEDEN LUIZ MARQUES MOREIRA; LAURO VARGAS; RICARDO PEREIRA RIBEIRO; SERGIO ZIMMERMANN. (Org.). *Fundamentos da moderna aqüicultura*. 1:123-133.

VENTURA, M. T.; PAPERNA, I. 1985. Histopathology of *Ichthyophthirium multifiliis* infections in fishes. *J. Fish Biol.*, 27(2):185–203.

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 22

Principais métodos terapêuticos para peixes em cultivo

Sérgio Henrique Canello Schalch, Marcos Tavares-Dias & Eduardo Makoto Onaka

Resumo

Neste capítulo, são apresentados e discutidos os produtos químicos, usualmente, empregados na aquicultura mundial e também usados na piscicultura de água doce brasileira, para controle e/ou tratamento de diferentes agentes infecciosos e parasitários. Além disso, são destacados as forma de uso destes produtos, tratamento, tempo de sua carência e as recomendações relevantes para uso na piscicultura. Entretanto, a prevenção é a melhor maneira de se evitar problemas de enfermidades nos peixes durante o cultivo.

Abstract

This chapter presents and discusses the common products chemotherapic used in world aquicultura, which are also used in Brazilian fish farms for treatment of infectious and parasitic agents. The use these products chemotherapic in control and treatment these diseases, as well as the time to lack of each one are also emphasized here. Furthermore, are emphasized the products must be used with caution, under orientation and supervision of a qualified professional to decide on its necessity of its use in the control and treatment of diseases, as well as the concentration for each case were reported. However, the prevention is the best way to prevent problems of diseases on culture fish.

Introdução

O ambiente aquático de criatórios artificiais facilita a invasão dos peixes por agentes patogênicos graças à maior concentração de animais por unidade de espaço, quando comparada à de ambiente natural. Além disso, a limitação imposta aos predadores de peixes doentes também colabora para a perpetuação e difusão dos patógenos no ambiente. Diversos sinais de comportamento anormal causado por patógenos podem ser observados nos peixes enfermos, tais como a letargia (movimentação lenta), anorexia (falta de apetite), perda de equilíbrio (peixe nada em espiral ou vertical), agrupamento na superfície ou entrada d'água, respiração agitada (maior batimento opercular), produção excessiva de muco provocando uma aparência opaca, erosão na pele e/ou nadadeiras, brânquias inflamadas ou pálidas, abdômen inflamado e algumas vezes com de líquido sanguinolento ou não, ânus inchado e enrijecido, exoftalmia (proeminência ocular), apatia, peixes isolados do cardume e morte.

Os parasitos são as maiores causas de perdas econômicas nas pisciculturas em todo o mundo, levadas perdas econômicas significativas. Por exemplo, no Japão estas perdas passam dos US$ 5,5 milhões (Hirazawa et al., 2001). No Brasil, ainda não se tem uma estimativa das perdas econômicas causadas por doenças nestas espécies. Porém, com o desenvolvimento da piscicultura e uso, há o crescente interesse de pesquisadores e criadores, no que se refere a estes prejuízos causados por mortalidade e problemas na produção de peixes, principalmente os nativos. Os cuidados na prevenção e controle das enfermidades para evitar perdas provocadas por doenças, infecciosas e parasitárias, em ambiente restritivo envolvem investimentos financeiros muito maiores se comparados aos sistemas extensivos. Assim, o monitoramento da criação e o manejo profilático devem ser constantes, pois sem que técnicas profiláticas sejam devidamente aplicadas nesses ambientes restritivos, as enfermidades podem ser fatores limitantes ao aumento nos ganhos econômicos.

Os parasitos podem provocar doenças e mortalidade indiretamente, já que favorecem a entrada de patógenos (bactérias, fungos e vírus), que muitas vezes são mais prejudiciais que eles próprios. Porém, estrutura de comunidades em associações de hospedeiro-parasito, é determinada por fatores como a idade, estrutura genética e hábitat da população hospedeira, bem como por interações entre as espécies de parasitos (Dobson & Keymer 1990). Assim, as enfermidades com ou sem mortalidades, em geral, não são mono-etiológicas. Contudo, para o desenvolvimento destas enfermidades, concorrem as más condições da água, o desequilíbrio fisiológicos do peixe, bem como a presença de agentes oportunistas e/ou patogênicos conviventes.

O tratamento de peixes parasitados deve ser realizado somente se estritamente necessário, uma vez que qualquer tipo de intervenção profilática ou terapêutica pode ocasionar estresse, o qual pode agravar ainda mais o estado de saúde desses animais, que muitas vezes podem estar bastante debilitados pela ação dos parasitos. Assim, dever ser usado sob a orientação e supervisão de um profissional capacitado, o qual deve decidir a necessidade de seu uso e as concentrações para o controle e tratamento das enfermidades.

A Figura 1 mostra alguns fatores que devem ser levados em consideração para a aplicação de qualquer produto em tanques/viveiros de cultivos ou aquários, com eficácia. Outros fatores como: níveis oxigênio dissolvido na água dos tanques/viveiros, níveis de amônia, pH, temperatura, densidade populacional, volume de água, teor de matéria orgânica e cálculos adequados do medicamento a ser usado, também devem ter atenção especial. Tais parâmetros físico-químicos da água devem ser monitorados antes e durante a aplicação de qualquer produto quimioterápico.

As concentrações usadas nos tratamentos antiparasitários, muitas vezes podem ser próximas da concentração letal para determinada espécie. Por isso, a Concentração Letal Média (CL_{50}) de cada substância deve ser previamente conhecida, para cada espécie de peixe, para que se possa assim realizar a profilaxia ou tratamento na criação. Essa determinação da toxicidade é feita com a exposição dos peixes a diferentes concentrações da substância de interesse, por um período de 24 a 96 horas (CL_{50}-24-96h). Com estes estudos de toxicidade, se obtém informações para se estabelecer a margem de segurança para uso do produto em determinada espécie, pois a duração de aplicação de cada produto é específica para cada espécie de peixe, idade e grupo de parasitos.
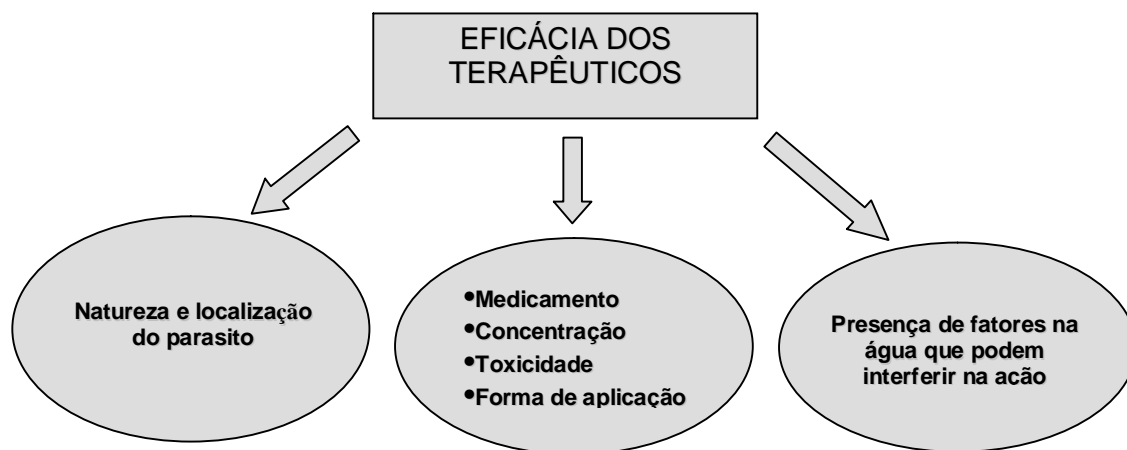
Figura 1. Importantes fatores a ser analisados antes do uso para controle e tratamentos parasitário em peixes na piscicultura.

Antes da aplicação de um produto nos tanques/viveiros, deve-se testá-lo em um pequeno lote de peixes, para evitar possíveis perdas do plantel. É importante salientar ainda, que todo e qualquer tratamento deve ser acompanhado por um profissional especializado e seguir normas de segurança que garantam a saúde do homem, quanto ao consumo desses peixes, além de evitar possíveis riscos de contaminação ambiental com a substância a ser usada.

As intervenções terapêuticas podem ser feitas através de diversas formas (Figura 2), mas os banhos de longa e curta duração, após diluição do terapêutico desejado, são os mais freqüentemente usados para tratamento de parasitos externos. Porém, a realização de tratamentos em tanques/viveiros de grandes dimensões é, geralmente, inviável do ponto de vista prático e econômico.
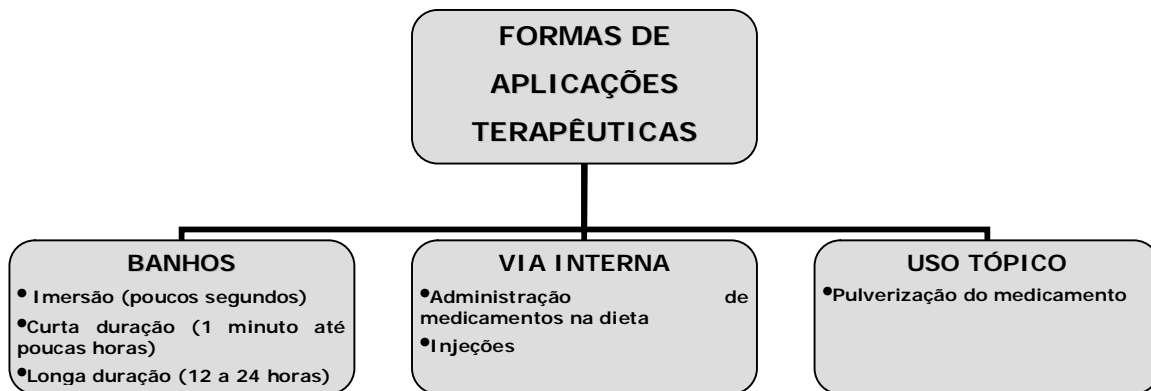
Figura 2. As diferentes formas de aplicação das substâncias terapêuticas em peixes.

Principais terapêuticos usados na aquicultura para patógenos e parasitos de peixes

Dependendo do agente patogênico, diferentes substâncias terapêuticas têm sido recomendadas para tratar peixes parasitos (Tabela 1). Porém, para aplicação em tanques/viveiros de grandes dimensões, muitos produtos são escolhidos devido ao baixo custo e facilidade na aquisição e aplicação, quando comparados a outros. Um exemplo disso é o sal (NaCl), que embora tenha elevado preço quando comparado ao sulfato de cobre e verde de malaquita (Carneiro et al., 2005), pode controlar

infestações causadas por diferentes parasitos, os quais o produtor não está apto a identificá-los, mas muitas vezes conhecem os sinais clínicos que os peixes apresentam. Porém, a aplicação incorreta de qualquer substância química como terapêutico, pode ocasionar aumento dos agentes patogênicos e estresse nos peixes, e por consequência mortalidade.

Portanto, em piscicultura, há sempre a necessidade de se obter informações prévias e precisas, para ter uma margem de segurança de qualquer produto químico para cada espécie peixe, garantindo a eficácia no controle e tratamento contra os parasitos e o sucesso na sobrevivência do plantel. Pois as informações sobre a concentração e a duração da exposição destes produtos não são específicas para cada espécie de peixe, tamanho (idade) e espécie de parasitos. Além disso, a concentração subletal de determinado produtos que pode ser usada para o peixe, nem sempre é letal para determinada espécie de parasito ou patógeno.

Tabela 1. Principais produtos usados na aquicultura para tratamento de patógenos em peixes de água doce e fatores que podem limitar sua aplicação em tanques/viveiros.

Substâncias	Principais patógenos	Fatores limitantes do uso
Cloreto de Sódio (NaCl) ou sal	*I. multifiliis*, *Trichodina*, *P. pillulare*, *Chilodonella*, *Argulus*, *Dolops*, fungos, Monogenea, Ergasilídeos, *Lernaea*, *Ichthyobodo necator*, *Flavobacterium*	Não há fatores conhecidos que impossibilitam o uso.
Permanganato de Potássio ($KMnO_4$)	Monogenea, *Trichodina*, *Argulus*, *Dolops*, *Chilodonella*, *Ichthyobodo necator*, bactérias gram negativas	Não deve ser usado em água com pH<5,0 e com excesso de matéria orgânica; reduz fitoplâncton; concentrações terapêuticas podem ser tóxicas para algumas espécies.
Sulfato de Cobre ($CuSO_4$)	Monogenea, *Trichodina*, *P. pillulare*, *I. multifiliis*, *Chilodonella*, bactérias, fungos	Alcalinidade <50 mg/L de $CaCO_3$ aumenta toxicidade; alcalinidade > 250 mg/L de $CaCO_3$ o produto é não efetivo; deixa resíduo de cobre nos tecidos por ≅ 25-30 dias
Sulfamerazina	Antibiótico para bactérias do gênero *Pseudomonas*	Pode ser tóxica quando administrada na dieta em concentração >220 mg/kg de peso corporal
Tetraciclina	Antibiótico para bactérias do gênero *Aeromonas,Pseudomonas,Edwardsiella*	
Cloramina-T	Monogenea, bactérias de pele e brânquias	Dose alta pode ser tóxica para algumas espécies. Dose usada depende do pH e dureza da água.
Formalina	Monogeneas, *I. multifiliis*, *P. pillulare*, *Trichodina*, *Chilodonella*, *Ichthyobodo necator*, *Argulus*, *Dolops*, fungos	Toxicidade aumenta em temperatura >22ºC.
Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)	Monogenea, fungos, bactérias	Toxicidade aumenta em temperatura elevada e concentrações terapêuticas podem ser estressantes para algumas espécies.
Ácido acético Diflubenzuron Praziquantel Levamisol Albendazol Mebendazol	Monogenea, *Trichodina*, *Chilodonella* *Lernaea*, *Argulus*, *Dolops* Monogenea, Cestoda, Digenea Monogenea Monogenea Monogenea	Não há fatores conhecidos que impossibilitam o uso.

Bactérias

Determinadas espécies de bactérias são potencialmente patogênicas para os peixes, principalmente em cultivo. Algumas espécies são consideradas oportunistas, uma vez que fazem parte da microbiota da água, pele, brânquias e intestino dos peixes, mas quando há um desequilíbrio no sistema bactéria-hospedeiro-ambiente, podem ocorrer epizootias. Por exemplo, *Edwardsiella tarda* uma bactéria emergente ocorre frequentemente no ambiente aquático e no intestino de peixes e outros vertebrados, porém em temperatura média de 30°C como as que ocorrem nas regiões tropicais, essa bactéria pode ser patogênica e causar a doença conhecida como septicemia dos peixes tropicais. Em peixes cultivados no Brasil, *Edwardsiella tarda* tem sido isolada em híbridos de pintado ou surubim (*Pseudoplatystoma fasciatum x P. curruscans*), *Colossoma macropomum*, tilápias *Oreochromis niloticus* e bagre do canal *Ictalurus punctatus* (Alexandrino et al., 1998/1999; Costa, 2004). Em tilápias (Muratori et al., 2001) e bagre do canal (Alexandrino et al., 1998/1999) esta bactéria causou septicemia e mortalidade.

Em geral, as bacterioses exigem a administração de antibióticos apropriados. *Flavobacterium columnare* isoladas de *I. punctatus*, *Ictalurus furcatus*, *Micropterus salmoides* e *Pimephales promelas* foram sensíveis a ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol e eritromicina, mas resistente a gentamicina e neomicina (Shamsudin & Plumb, 1994). Alexandrino et al.(1998/1999) relatam que *E. tarda* coletadas de trutas arco-íris cultivadas foi sensível aos antibióticos tetraciclicina, amoxilina, gentamicina e cloranfenicol, mas tetraciclina foi mais indicado para tratamento desta bacteriose. Contudo, o uso de cloranfenicol é proibido no Brasil, pois este antibiótico deixa resíduos que constituem um risco para a saúde do homem (Andrade et al., 2006), assim outros antibióticos são mais recomendados.

Bactérias do gênero *Psedomonas*, *Flavobacterium*, *Aeromonas* e *Vibrio* isoladas de tainhas *Mugil platanus* foram sensíveis ao cloranfenicol, tetraciclina e oxitraciclina (Sousa et al., 1999). Carnevia et al.(2003) demonstram em estudos *in vitro*, que *Aeromonas hydrophila* é resistente a antibióticos como a ampicilina, sulfatrimetoprim, cloranfenicol e tetraciclina, mas não a gentamicina e kanamicina. Em bagre do canal *I. punctatus*, a oxitetraciclina na dieta foi efetiva no tratamento de colunariose (Thomas-Jinu & Goodwin, 2004). Porém, em tilápias esse antibiótico causou imunodepressão e grave processo anemiante, após oito semanas de administração terapêutica na dieta dos peixes (Omoregie & Oyeban, 2002). Além disso, várias dessas bactérias e outras (Sorum, 1999; Lima et al., 2006), tem sido descritas como resistentes a diferentes antibióticos, devido ao seu uso indiscriminado na aquicultura. Por isso, outros produtos vêm sendo também testados para o tratamento de infecções bacterianas. Contudo, recentemente foi demonstrado que bactérias *Aeromonas salmonicida*, isoladas de *Oreochromis niloticus*, *Brycon orbignyanus*, *Pseudoplatystoma coruscans* e *Rhamdia quelen* não apresentam resistência ao florfenicol e biciclomicina (Godoy et al., 2008).

Em bagres do canal *I. punctatus* altamente infectados com *F. columnare* (colunariose), banhos com 2 mg/L de permanganato de potássio ($KMnO_4$), 1 mg/L de sulfato de cobre ($CuSO_4$), 75 mg/L de peróxido de

hidrogênio (H_2O_2) e 15 mg/L de cloramina-T, por tempo indefinido, causaram elevada mortalidade nos peixes (Thomas-Jinu & Goodwin, 2004). Isso indica que peixes altamente infectados não toleram altas doses desses quimioterápicos. Por isso, para bagre do canal com colunariose, o $KMnO_4$ tem sido recomendado somente para uso profilático, mas não para tratamento desta infecção (Darwish et al., 2009).

Para trutas arco-iris *Oncorhynchus mykiss*, dois banhos semanais com 200 mg/L de H_2O_2 foram efetivos para a colunariose (Speare & Arsenault,1997). Todavia, a toxicidade do H_2O_2 aumenta com a temperatura da água (Johnson et al., 1993), assim deve ser usado com cautela para peixes tropicais. Estudos recentes demonstraram que, para o tambaqui *Colossoma macropomum*, em temperatura média de 27ºC, concentrações de até 126 mg/L de peróxido de hidrogênio não foram estressantes (Affonso et al., 2009).

Devido todos estes problemas com uso dos antibióticos na piscicultura, métodos alternativos no tratamento de algumas espécies de bactérias patogênicas para os peixes têm sido investigados. Nuñez et al. (2001) relatam atividade antimicrobicida de extratos do eucalipto (*Eucalyptus* sp.), aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e fedegoso-gigante ou mangerioba-do-pará (*Cassia alata*) contra *Aeromonas Salmonicida* e *Aeromonas hydrophila*, obtidas de peixes enfermos. Similarmente, Castro et al. (2008) encontraram atividade antimicrobicida contra *Streptococcus agalactiae*, *F. colunnare* e *A. hydrophila* em 31 extratos dos 40 investigados. Prieto et al. (2005) citam que 50 mg de extrato o alho (*Allium sativum*) durante três dias consecutivos tem o mesmo efeito antibiótico que a penicilina, em infecções causadas por A. *hydrophila* e *Pseudomonas flurescens*. Em *Labeo rohita*, foi demonstrado que o uso de 1 g alho/kg de ração já suficiente para estimular o sistema imunológico e torna os peixes mais resistentes a infecções por A. *hydrophila* (Sahu et al., 2007). Similarmente, Shalaby et al. (2006) recomendam que 3% de alho adicionado à ração para *O. niloticus*, além de auxiliar no crescimento reduz o número de bactérias e melhora a saúde dos peixes. Assim, no Brasil, tratamentos com estas substâncias naturais, farmacologicamente ativas, poderão ser uma alternativa viável para diminuir estes danos causados pelos antibióticos na aquicultura, bem como os gastos com tratamentos.

Tabela 2. Alguns antibióticos indicados para controle e tratamento de diferentes espécies de bacterioses em peixes.

Bactérias	Dose e Produto	Tratamento	Referências
F. columnaris	80 mg/Kg oxitetraciclina	Adicionado à ração	Thomas-Jinu & Goodwin (2004)
F. columnaris	200 mg/L H_2O_2	Banho: 60 min	Spearse & Arsenault (1997)
T. maritimum	240 mg/L H_2O_2	Incubação *in vitro*: 24 horas	Avendaño-Herrera et al. (2006)
E. tarda	80 mg/Kg oxitetraciclina	Ração	Alexandrino et al. (1998/ 1999)
A. hydrophila	1 mg/L cloranfenicol+4 mg/L de NaCl	Banhos	Andrade et al. (2006)
A.hydrophila	4 mg/L cloranfenicol+4 mg/L NaCl	Banho	Andrade et al. (2006)

Fungos

As infecções fúngicas, são em geral, causadas pela baixa qualidade da água, má nutrição, danos de manejo, estresse por elevada densidade populacional, queda brusca de temperatura, estresse de reprodução e parasitos externos. Além disso, pode também ocorrer como infecção secundária, em consequência de bacterioses e viroses. A pele, nadadeiras e brânquias dos peixes de água doce e de estuários podem ser parasitadas por vários fungos, principalmente, Phycomycetos dos gêneros *Saprolegnia* (*S. diclina*, *S. ferax*, *S. parasitica*), *Achlya* (*A. debaryana*, *A. flagellata*, *A. klebsiana*), *Aphanomyces*, *Branchiomyces* (*B. sanguinis*, *B. demigrans*), *Exophiala* (*E. salmonis* e *E. psychrophilia*), *Pythium* e *Ichthyophonus*. No Brasil, a saprolegniose é a doença fúngica mais comum e ocorre frequentemente na época mais fria do ano (outono e inverno) nas regiões Sul e Sudeste. Na Amazônia, às elevadas temperaturas, não favorecem o surgimento de doenças fúngicas nos peixes, embora espécies patogênicas podem estar presentes no ambiente aquático.

Em Ictalurus punctatus, 25 mg/L formol foi efetivo tanto na profilaxia como tratamento da saproleniose, enquanto que 0,1 mg/L de sulfato de cobre ($CuSO_4$) e 5g de NaCl foram efetivos somente quando usados como profiláticos, pois não tiveram efeito no tratamento dos peixes doentes (Li et 1996). Em *Catla catla*, *Labeo rohita* e *Cirrhinus mrigala* parasitados por *S. parasitica*, banhos com 0,01 mg/L verde malaquita mostrou 95% de efetividade (Singhal *et al.*,1986). Estudos *in vitro*, com ovos de truta arco-iris, demonstraram que altas concentrações de verde malaquita (5 mg/L), formol (1,7 mg/L) tem atividade fungicida. Porém, 30 mg/L de NaCl e 200 mg/L de glutaraldeído são compostos mais efetivos, enquanto 100 mg/L de permanganato de potássio é mais eficiente quando em elevados níveis de infecção (Schreck et al.,1992). Outros produtos químicos indicados para tratamento de peixes com fungos estão na Tabela 3.

As doenças fúngicas, principalmente aquelas causadas por ficomicetes saprófitas, pode causar epizootias tanto em peixes de consumo como em peixes ornamentais, e o tratamento é difícil e oneroso (Prieto et al., 2005). Em trutas-arco-iris infectadas por *S. parasítica*, tratamentos com 50, 100 e 150 mg/L de formol reduziu em 40-59% a mortalidade dos peixes, quando comparados aos peixes não tratados (Gieseker et al., 2006). Porém, em geral, o formol pode ser tóxico para os peixes, dependo da concentração usada e da espécie hospedeira. Além disso, a sua toxicidade aumenta com a temperatura, o que limita seu uso em regiões com temperaturas elevadas.

Assim, tem sido sugerido que tratamentos com extratos de plantas podem ser uma alternativa para uso em pisciculturas. Em uma recente revisão, Prieto et al. (2005) citam algumas plantas cujos extratos podem ser usados na piscicultura para o tratamento de doenças fúngicas: o alho (*A. sativum*), erva-de-bicho (*Polygonum hydropiper*), burra-leiteira (*Sapium sebiferum*), acalifa (*Acalypha australis*), arbusto cairatia (*Cayratia japonica*), artemisia (*Artemisia argyi*), morango silvestre (*Duchesnea indica*), helenio (*Helenium quadridentatum*), e cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*). Além de algumas dessas plantas serem encontradas no Brasil, as sete primeiras supracitadas, segundo estes mesmo autores, também tem efeito bactericida

para espécies de bactérias patogênicas de peixes, o que torna seu uso viável e interessante.

Tabela 3. Produtos químicos indicados para tratamento de fungos em diferentes de peixes de água doce.

Hospedeiros	Dose e Produto	Tratamento	Referências
Catla catla, *Labeo rohita* e *Cirrhinus mrigala*	100 mg/L $KMnO_4$	Banho: 5 min	Singhal et al.(1986)
Catla catla, *Labeo rohita* e *Cirrhinus mrigala*	30 mg/L NaCl	Banho: 2 min	Singhal et al.(1986)
Catla catla, *Labeo rohita* e *Cirrhinus mrigala*	20 mg/L $CuSO_4$	Banho: 2 min	Singhal et al.(1986)
Ictalurus punctatus	25 mg/L formol	Na água	Li et al.(1996)
Oncorhynchus mykiss	100 mg/L formol	Banho: 4 h	Gieker et al.(2006)

Protozoários parasitos

A - *Ichthyophthirius multifiliis*

Este é o protozoário causador da ictiofitiríase, patologia conhecida como “doença dos pontos brancos”, e muito comum em peixes cultivados em pisciculturas de algumas regiões brasileiras, bem como em diversas partes do mundo. O controle e tratamento desta parasitose em tanques/viveiros, pode ser feito usando diversos quimioterápicos (Tabela 4), além de 10-15 mL de formol comercial (Moraes & Martins, 2004).

Em *Rhamdia quelen*, parasitados por *A. hydrophila* e *I. multifiliis* tratamentos com sal não iodado associado ao cloranfenicol ou à tetraciclina foram efetivos para ictiofitiríase (Andrade *et al*., 2006), devido à ação do sal, como tem sido demonstrado por Miron et al.(2003), nesse mesmo bagre.

O sulfato de cobre ($CuSO_4$), produto amplamente utilizado no controle de algas em tanques/viveiro (Perschbacher, 2005), também tem sido usado para controle de infecções por *I. multifiliis*. Porém, análise prévia dos parâmetros físico-químicos da água é de grande importância se evitar toxicidade do sulfato de cobre (Martins, 2004; Perschbacher, 2005). Este produto não é recomendado para uso em águas com baixa alcalinidade (<50 mg/L $CaCO_3$), pois é muito tóxico para os peixes. Porém, em água com alcalinidade acima de 250 mg/L não tem qualquer efeito terapêutico.

A toxicidade do ($CuSO_4$) além de ser altamente influenciada pela alcalinidade, também sofre influência dureza da água, pois quando aplicado em águas com baixas concentrações de $CaCO_3$ (Wurts & Perschbacher, 1994; Straus, 2003; Adhikari, 2003) os íons cúpricos (Cu^{++}) causam sérios danos à fisiologia dos peixes. Nos peixes de água doce, a absorção do sulfato de cobre é feita na forma de Cu^{++}, que pode absorvido pela pele e/ou brânquias.

Mas o seu transporte é feito pelo sangue quando os íons Cu^{++} se ligam a proteínas e podem chegar até os tecidos hematopoiéticos, rim, baço e fígado (órgãos produtores de células sangüíneas), que podem ser comprometidos, assim como as brânquias.

Em geral, tem sido recomendada a aplicação de 1 mg de $CuSO_4$ para cada 100 mg de $CaCO_3$ na água. Entretanto, a sua toxicidade pode variar também entre as espécies de peixes e na dependência do tamanho dos animais. Assim, é importante conhecer a CL_{50}-96h previamente estabelecida para a espécie a ser tratada. Schlenk (1998) relata que em *I. punctatus*, pode 0,4 mg/L de $CuSO_4$ pode ser usado durante cinco dias para tratamento de *I. multifiliis*, em água com elevada alcalinidade (176,6 $\pm$ 28,1) e pH alcalino, mas o excesso de matéria orgânica na água tem mais efeito da eficácia deste químico que a alcalinidade. Portanto, a eficácia do $CuSO_4$ pode ser reduzida na presença de sólidos suspensos na água (Schlenk et al., 1998; Moraes & Martins, 2004).

Tabela 4. Produtos indicados para controle e tratamento de *I. multifiliis* em diferentes de peixes de água doce.

Hospedeiros	Dose e Produto	Tratamento	Referências
Rhamdia quelen	4 mg/L NaCl	-	Miron et al.(2003)
Rhamdia quelen	4 mg/L NaCl	Banho: 96 h	Andrade et al. (2006)
Rhamdia quelen	10 g/L NaCl	Banho:192 h	Carneiro et al.(2005)
Rhamdia quelen	0,63 mg/L $CuSO_4$	Banho:192 h	Carneiro et al.(2005)
Poecilia sphenops, *Xiphophorus helleri* e *Hyphessobrycon herbertaxelrodi*	5 g/kg quinina	Adicionado na ração	Schamahl et al. (1996)
Steindachneridion sp.	25 mg/L formol	Adicionado na água: 7 dias	Klein et al. (2004)

Em *O. niloticus*, banhos de 10 minutos com sal a 3,0% ou 50 e 250 mg de formol não foram eficientes no tratamento da ictioftiríase (Vargas et al., 2003). Klein et al. (2004) relataram que em surubim *Steindachneridion* sp. infectados com *I. multifiliis*, tratamento com sal a 3% e permanganato de potássio não foram eficientes quanto 25 mg/L de formol. Por outro lado, 250 mg/L de formol mais foi eficiente que 25 mg/L, mas nesta alta concentração sobrevivência dos peixes foi menor. Estudos em *C. macropomum* demonstraram que formol nas concentrações de 100 e 150 mg/L durante 30,60 e 120 minutos, bem como nas concentrações de 200 e 250 mg/L, até 30 minutos, não comprometem a homeostasia dos peixes, ao contrário do que ocorre com 200 e 250 mg/L quando em banhos prolongados (Araújo et al., 2004). Esses resultados sugerem que dependendo da dose do produto e

do tempo de exposição, o formol é tóxico para os peixes, e consequentemente causa estresse e alterações fisiológicas.

Para o tratamento da ictioftiríase, foi sugerida a associação de verde de malaquita com formol, para reduzir surtos de mortalidade dos peixes (Figueira et al., 1991). Em alevinos de *P. mesopotamicus*, após 72 horas de tratamento a combinação formol (1,0%) e verde malaquita (0,015%) foi mais efetiva que o uso do formol ou verde malaquita, apenas (Alcântara et al., 1994). Para larvas e alevinos de jundiá *Ramdia* sp., foi sugerido o uso de 3 mg/L de NaCl ou solução de verde malaquita (25 mL/1000 litros de água) com formol (4 g de verde malaquita diluído em um litro de formol 40%) para o controle de *I. multifiliis*, mas para o tratamento com 6 mg/L de NaCl ou 10 mL/1000 litros de água de verde malaquita com formol, durante cinco dias contínuos (Brito et al., 2000). Contudo, o verde malaquita não é recomendado para uso em peixes de consumo em diversos países, pois além de acumular nos tecidos dos peixes causando grande risco ao consumo pelo homem (Jiang et al., 2009), pois considera-se que este químicos é teratogênico e carcinogênico (Schamahl et al., 1996; Pironet & Jones, 2000; Diggles, 2000; Jiang et al., 2009). Assim, verde malaquita tem sido usado somente para tratar protozoários (*I. multifiliis*, *Trichodina* sp., *Chilodonella* sp.) em peixes ornamentais, adicionado à ração (Schamahl et al., 1996).

Devido às várias limitações destes produtos químicos, esforços têm sido direcionados para os extratos de plantas para tratar peixes parasitados por *I. multifiliis*, com alguns resultados promissores. Em *Carassius auratus auratus*, banhos de 72 horas com 200 mg/L de mucuna-preta (*Mucuna pruriens*) ou com papaia (*Carica papaya*) reduziram em 90% o número de *I. multifiliis*, enquanto tratamento *in vitro* com 150 mg/L de mucuna-preta ou 200 mg/L de papaia causou a mortalidade de 100% dos parasitos (Ekanem et al.,2004). Prieto et al. (2005) sugerem que extratos de pinheiro do gênero *Pinus* e alho (*A. sativum*) também podem ser usados para controle e tratamento de *I. multifiliis* em peixes cultivados.

B - Piscinoodinium pillulare

A maioria dos parasitos frequentes nas pisciculturas é considerada organismos comensais e só em condições propícias, que em geral, são fornecidas por este ambiente, exercem o parasitismo propriamente dito em peixes de cultivo. O *P. pilullare* que embora seja encontrado nos peixes, também está presente no substrato dos tanques de criação. Esse dinoflagelado é primitivo, e tem como uma de suas características marcantes, a presença de cloroplastos (Lom, 1981), os quais poderiam ter função de fotossíntese e, nesse caso, o parasitismo pode não ser obrigatório, sendo o peixe apenas mais um substrato para sua fixação.

Todavia, causam hemorragias petequiais no tegumento, degeneração e necrose das células afetadas, podendo haver inflamação. Quando nas brânquias, provocam hiperplasia interlamelar nas lamelas secundárias, diminuindo da capacidade respiratória. Em poucos dias pode haver mortalidade maciça nos peixes da piscicultura, altamente parasitados (Onaka, 2009).

O controle das infecções causadas por *P. pillulare* em tanques/viveiros pode ser feito com cloreto de sódio e formol, de modo similar ao tratamento para

ictioftiríase (Moraes & Martins, 2004). Em *O. niloticus*, banhos com solução de formol a 4,0% por três dias, durante 30 minutos, mostraram bons resultados no controle deste protozoário (Muratori et al., 2000), mas 25 mg/L foram tóxicas e causaram anemia e hiperglicemia (Omoregie et al., 1994). Essa hiperglicemia indica sinais de estresse causado pelo produto.

O sulfato de cobre também pode ser usado no tratamento de *P. pillulare*, mas esse produto é contaminante do ambiente aquático, exercendo diferentes efeitos agudos e crônicos em populações de peixes. Ele pode danificar as brânquias, fígado e rim dos peixes (Sanchez et al., 2005) tratados, bem como causar alterações fisiológicas (Tavares-Dias et al., 2002). O uso deste quimioterápico deve ser parcimonioso, pois sua toxicidade varia entre as espécies de peixes (Sanchez et al., 2005) e esse agente que exerce efeitos estressantes, pode comprometer a sobrevivência e o desempenho zootécnico dos peixes, em particular das espécies que preferem viver no fundo do tanques/viveiros.

C – Trichodina sp.

As infecções causadas por *Trichodina* sp. (tricodiníase) podem ser tratadas com sal (NaCL) ou formol (Tabela 5). Em *Astyanax bimaculatus*, infectados por *Trichodina* sp., banhos com formol ou verde malaquita foram efetivos no tratamento, mas a combinação formol e verde malaquita foi mais eficaz que ambos produtos isolados (Alcântara *et al*., 1993). Em alevinos de *P. mesopotamicus*, banhos de formol (0,017% ou 0,025%) combatem os parasitos, mas são letais para os peixes (Ceccarelli et al., 1993). Porém, sugere-se que o controle da tricodiníase pode ser feito com os mesmos produtos utilizados para o controle de outros protozoários, desde que se mantenha o cuidado com a temperatura e a qualidade da água no momento da aplicação. Todavia, o acompanhamento sanitário da criação e aplicações profiláticas de 40 a 100 mg de cloreto de sódio/L de água possui ação (Moraes & Martins, 2004), pois dosagens inferiores a essas não são efetivas na eliminação desses protozoários.

Vargas et al. (2003) relataram que em *O. niloticus*, banhos de 10 minutos com cloreto de sódio a 3,0% reduziu o número de *Trichodina* sp., mas não eliminou o parasito à semelhança do que ocorreu com 250 mg de formol. Para tratamento da tricondiníase, no peixe marinho *Colistium nudipinnis*, foi demonstrado que 200 mg/L de formol eliminou os parasitos e promoveu a sobrevivência de 100% dos peixes, mas uma menor concentração de formol (25 mg/L) quando associada ao verde malaquita (0,08mg/L) também teve efeito similar; enquanto 3 mg/L de $CuSO_4$ causou 100% de mortalidade dos peixes sem eliminar os parasitos (Diggles, 2000). Contudo, este autor utilizou $CuSO_4$ em água alcalina, mas sem descrever a alcalinidade e dureza da água para esse tratamento com o $CuSO_4$.

Em *Anguilla anguilla*, criadas em sistema de recirculação, concentrações de formol variando de 50 a 120 mg/L podem ser efetivas no tratamento de tricodiníase, mas não controlam a infecção, assim como 200 mg/L de extrato de alho (Madsen et al., 2000). Portanto, em peixes mantidos em tanques/viveiros os resultados poderam ser mais significativos.

Tabela 5. Produtos indicados para controle e tratamento de *Trichodina* sp. em diferentes espécies de peixes.

Hospedeiros	Dose e Produto	Tratamento	Referências
H. molitrix	3 g/L NaCl	Banho: 10 min	Singhal et al. (1986)
C. mrigala	3 g/L NaCl	Banho: 10 min	Singhal et al. (1986)
H. molitrix	0,005 mg/L formol	Banho: 10 min	Singhal et al. (1986)
C. mrigala	0,005 mg/L formol	Banho: 10 min	Singhal et al. (1986)
H. molitrix	0,001 mg/L ácido acético	Banho: 10 min	Singhal et al. (1986)
C. mrigala	0,001 mg/L ácido acético	Banho: 10 min	Singhal et al. (1986)
P. mesopotamicus	0,017-0,025% formol	Banho: 30 min	Ceccarelli et al.(1993)
P. mesopotamicus	250 mg/L formol	Banho:30-60 min	Ceccarelli et al.(1993)
C. nudipinnis	200 mg/L formol	Banho:30-60 min	Diggles (2000)
A. bimaculatus	0,0025% formol	Banho:72 h	Alcântara et al.(1993)
A. anguilla	1 mg/L verde malaquita	Banho:3 h	Madsen et al.(2000)
A. anguilla	20 mg/L $KMnO_4$	Banho: 3 h	Madsen et al.(2000)
A. anguilla	200 mg/L extrato alho	Banho: 3 h	Madsen et al.(2000)
A. anguilla	50 Cloramina T	Banho: 3 h	Madsen et al.(2000)
A. anguilla	85 mg/L formol	Banho: 3 h	Madsen et al.(2000)

H. molitrix: *Hypophthalmichthys molitrix*; *C. nudipinnis*: *Colistium nudipinnis*

Mixosporídeos

Os mixosporídeos são parasitos de diversos órgãos dos peixes e a maioria destes parasitos ataca somente uma única espécie. Entretanto, uma espécie de peixe pode albergar dezenas de espécies de mixosporídeos (Békési et al., 2002). O tratamento para mixosporídeos é muito difícil, devido à formação de cistos nos tecidos (pele, brânquias, coração, músculos, rim, baços, fígado, gônadas, e outros) e estes cistos impedem a penetração de medicamentos. Além disso, os esporos dos mixosporídeos podem viver por longo tempo, alguns chegam a durar mais de um ano. Em geral, deve ser eliminado o estoque infectado, nos casos de infecção muito grave, e erradicar os parasitos dos tanques/viveiros, uma vez que não há tratamento efetivo. Singhal et al. (1986) sugerem que tanques/viveiros com infecção por mixosporídeos devem ser secos e desinfetados com 1 mg/L de permanganato de potássio ou 1 mg/L de hidróxido de cálcio.

Em geral, as espécies de mixosporídeos que infectam os peixes cultivados no Brasil, não causam mortalidade como ocorre em outras doenças parasitárias. Apesar dos parcos conhecimentos para tratar infecções por mixosporídeos (mixosporidiose), tem sido sugerido que em *P. mesopotamicus* o controle de *Henneguya piaractus* com óxido de cálcio (14g/L) pode reduzir os esporos (Moraes & Martins, 2004). Para *Myxobolus* sp. em *C. mrigala* e *Channa punctatus*, 1-10 mg/L de hidróxido de cálcio, 20 mg/L de permanganato de potássio ou 0,004 mg/L de formol pode eliminar 100% dos esporos (Singhal et al.,1986). Hirazawa et al. (2001) usando estudos *in vitro*, verificaram que 1 mM

de ácido de caprilico, extraído do óleo de coco ou outro óleo comestíveis, eliminou os esporos de *Kudoa shiomitsui*, mixosporídeo de peixes marinhos.

Crustáceos parasitos

Os crustáceos podem causar sérios danos, principalmente, em peixes cultivados. Há registros de crustáceos causando problemas em diversas espécies em cultivo em países de todos os continentes. No Brasil, a *Lernaea cyprinacea* encontra-se amplamente disseminada nas pisciculturas de quase todas as regiões. Por isso, é um dos parasitos causando prejuízos aos criadores e peixes (Tóro et al., 2003; Pavanelli et al., 2008). Infestações maciças tornam os peixes completamente desfigurados e são rejeitados pelos consumidores devido ao seu aspecto. Os peixes altamente parasitados se chocam contra as paredes do tanque, sobem à superfície e se aglomeram na entrada da água e apresentam-se apáticos, anoréxicos e com hemorragias puntiformes no corpo (Moraes & Martins, 2004). Consequentemente, a ocorrência de infecções secundárias por bactérias e/ou fungos é relativamente comum nesses peixes parasitados.

Para o controle da enfermidade de parasitos crustáceos o ideal é o acompanhamento constante e a prevenção, para impedir a contaminação ambiental, pois o tratamento não é adequado por várias razões. Há recomendações para o uso de banhos com organofosforados como 0,25 mg/L de triclorfon e neguvon, mas há o risco da contaminação ambiental e o desenvolvimento de resistência pelo parasito (Tonguthai, 1997; Moraes & Martins, 2004). Outro organofosforado recomendado é o folidol, na concentração de 0,25 mg/L de água em quatro tratamentos semanais ao longo de 30 dias, onde as formas juvenis dos parasitos são totalmente eliminadas.

Para *L. cyprinacea*, a associação de folidol com ascículas de pinus (*Pinnus elliot*) foi avaliada com relativo sucesso em *P. lineatus*, *P. masopotamicus*, *C. macropomum* e híbrido tambacu (Vilem et al., 1998). Estudos *in vitro*, demonstraram que resina este de pinus foi efetiva para matar *L. cyprinacea* e concentração subletal para tratamento de *Leporinus piau* com esta substância deve ser abaixo de 200 mg/L (Toró et al., 2003).

Foi demonstrado que em *P. mesopotamicus* o tratamento com 200 g de diflubenzuron/m^3 de água eliminou 100% dos parasitos presentes nos peixes. O diflubenzuron além de não ser tóxico para o animal inibe a formação de quitina (Moraes & Martins, 2004). Recentemente, após avaliar a toxicidade do diflubenzuron (5-500 mg/L) para alevinos de jaú *Zungaro zungaro*, Pelli et al. (2008) consideraram que este produto pode ser usada na piscicultura, para outros peixes também. Como produtos os químicos para controle de parasitoses quando não causam estresse nos peixes podem prejudicar o meio ambiente aquático, assim há necessidade de métodos alternativos para controle de parasitos crustáceos, bem como de outras doenças parasitárias.

Outros crustáceos importantes na piscicultura são os ectoparasitos do gênero *Argulus* e *Dolops*, também conhecidos como carrapatos ou piolhos de peixes. Cosmopolitas, ocorrem tanto em peixes de água doce como salgada. No hospedeiro, localizam-se em geral na superfície do corpo, nadadeiras e brânquias. Em aquário ou caixa de água, com peixes infectados é mais fácil

observar os ovos nas paredes, do que os animais adultos sobre os hospedeiros. Após um período de incubação de 10 a 20 dias, os jovens argulídeos liberam-se e nadam à procura de um peixe hospedeiro.

Os efeitos das infestações por argulídeos podem ser tanto diretos quanto indiretos. Os diretos estão associados às lesões causadas no tegumento dos peixes, com ruptura da integridade da epiderme e conseqüente instalação de infecção secundária, por microrganismos oportunistas. Os efeitos indiretos estão relacionados ao estresse, que quando crônico pode causar imunossupressão, tornando os peixes susceptíveis a outras infecções. Além disso, quando os peixes estão altamente parasitados, a mortalidade no cultivo é normalmente devido ao desequilíbrio iônico provocado por estes parasitos, bem como pelo aumento da susceptibilidade às infecções secundárias (Castro & Fernandes, 2009).

Infecções por argulídeos são difíceis de prevenir ou tratar. No caso de aquários, a primeira indicação de problemas são os ovos aderidos no vidro. Porém, em tanques/viveiros essa constatação é feita, geralmente, após observado o parasito no corpo dos peixes. O tratamento pode ser feito então com banhos de neguvon ou triclorfon. No caso de aquários, o mais conveniente é enchê-lo com uma solução de hipoclorito de sódio a 5%, por 10 horas. Os tanques ou viveiros com grande infecção devem ser drenados e o fundo coberto com óxido de cálcio, por 2-3 dias. Contudo, o formol, independente da dose aplicada, não é efetivo no tratamento de *Argulus* sp. (Souza & Afonso, 1993), bem como de outros crustáceos.

Tabela 7. Produtos indicados para controle e tratamento de infestações causadas por crustáceos argulídeos do gênero *Dolops* e *Argulus*, em diferentes peixes de água doce.

Hospedeiro	Dose e Produto	Tratamento	Referências
Catla catla	3 g/L NaCl	Banho: 2 -5 min	Singhal et al. (1986)
C. idella	3 g/L NaCl	Banho: 2 -5 min	Singhal et al. (1986)
Labeo rohita	3 g/L NaCl	Banho: 2 -5 min	Singhal et al. (1986)
H. molitrix	3 g/L NaCl	Banho: 1 -2 min	Singhal et al. (1986)
C. mrigala	3 g/L NaCl	Banho: 1-2 min	Singhal et al. (1986)

Nas carpas *Catla catla*, *C. idella* e *Labeo rohita*, banhos de 2 a 5 minutos com cloreto de sódio 3,0% reduz em 97% a infestação de *Argulus indicus*; enquanto em *Hypophthalmichthys molitrix* e *Cirrhinus mrigala*, banho de apenas 1 a 2 minutos foi suficiente para eliminação desse crustáceo. O início da infestação pode ser controlado com banhos de 0,01 mg/L de ácido acético, por 5 minutos. Porém, 0,5 mg/L de permanganato de potássio reduz somente 60% dessa infestação (Singhal et al., 1986), indicando que possivelmente uma maior concentração poderia apresentar melhores resultados. Assim, em tanques ou aquários de pequenas dimensões a utilização de banhos diários de cloreto de sódio de 1,0 a 3,0% elimina os

parasitos da superfície corporal dos peixes (Moraes & Martins, 2004). De forma, para controle da parasitose podem ser usados os mesmos produtos que são usados para tratar a lerneose, mas apesar da redução dos parasitos com o tratamento, os peixes podem apresentar alterações fisiológicas.

Em *C. carpio* o tratamento com 2,5 g/L de neguvon, em banhos de 10 minutos, para *Argulus* sp., aumentou o número de eritrócitos e leucócitos, concentração de hemoglobina (Ranzani-Paiva et al., 1987) e os valores plasmáticos de sódio e potássio (Ranzani-Paiva et al.,1989). Similarmente, em *P. mesopotamicus*, tratamento com 0,4 mg/L de triclorfon para argulose provocou redução do número de eritrócitos e concentração de hemoglobina (Tavares-Dias et al., 1999). Entretanto, as alterações fisiológicas podem variar com a espécie de peixe e o produto empregado no tratamento dessas parasitoses.

Monogenoidea

Peixes recém obtidos, de qualquer origem, devem ser examinados e tratados antes de ser introduzidos em tanques/viveito ou aquários contendo animais sadios. O controle e tratamento desses helmintos parasitos podem ser feito com diferentes substâncias (Tabela 6). Porém, o tempo e forma de tratamento são variáveis, pois diferentes espécies de peixes têm grau de tolerância distinto aos produtos químicos, assim como os monogenóides.

Estudos demonstraram que 5,0 mg/L de mebendazol aplicado na forma de banhos com 24 horas de duração, apresentou 100% de eficácia em carpas *Cyprinus carpio* e 81,3% no pacu, *P. mesopotamicus* na eliminação de monogenóides. A diferença de eficácia do produto entre os dois peixes provavelmente se deva ao fato de que o pacu é mais susceptível ao parasito do que a carpa (Moraes & Martins, 2004). Em pacus esse tratamento causou aumento do hematócrito, concentração de hemoglobina e percentual de trombócitos e linfócitos, na dependência na dose empregada (Martins et al., 2001). Por outro lado, em *Pagrus pagrus*, banho de uma hora com 400 mg/L de mebendazol não teve efeito na infestação branquial por *Microcotyle* sp. (Katharios et al*.,* 2006), pois esse antihelmintítico é mais efetivo contra esse monogenético quando administrado na dieta.

Em juvenis de *C. macropomum*, banhos de 15, 30, 45 e 60 minutos com 250 mg/L de permanganato de potássio não tiveram efeitos sobre a infestação de monogenóides *Anacanthorus spathulatus* e *Notozothecium janauchaensis*. Porém, tratamento com 250 mg/L nessas mesmas condições, mostrou que banhos de 60 min tiveram maior eficácia (Porto et al., 2005). Em peixes marinhos, *Glaucosoma hebraicum*, banho de cinco horas com 1,1 mg/L de triclorfon ou com 150 mg/L de formol, por uma hora, não foram efetivos no tratamento de monogenóides da subfamília Axininae, enquanto banho com 1,25 mg/L de triclorfon, por 15 horas, foi parcialmente efetivo e matou 50% dos peixes. Porém, 4,2 mg/L de permanganato de potássio causou mortalidade de 100% dos peixes (Pironet & Jones, 2000), mostrando ser altamente tóxico para esse peixe de água salgada.

Tabela 6. Produtos indicados para controle e tratamento de diferentes espécies de Monogenoidea de peixes.

Monogenoidea	Dose e Produto	Tratamento	Referências
Pseudodactogirus sp.	1 mg/L mebendazol	Banho:24 h	Buchamann & Bjerregaard (1990)
P. anguillae, P. bini	2-20 mg/L $KMnO_4$	Banho: 5 h	Umeda et al. (2006)
P. anguillae, P. bini	2,4-3,4 g/L NaCl	Banho: 5 h	Umeda et al. (2006)
P. anguillae, P. bini	24-60 mg/L cloramina-T	Banho: 5 h	Umeda et al. (2006)
Gyrodactylus sp.	25 mg/L mebendazol	Banho: 12 h	Tojo et al. (1992)
A. penilabiatus	10 mg/L mebendazol	Banho: 24 h	Martins et al. (2001)
Dawestrema sp.	100 mg/L mebendazol	Banho: 30 min	Cavero et al. (2002)
Haliotrema abaddon	2 mg/L praziquantel	Banho: 30 h	Stephens et al. (2003)
A. penilabiatus	10 mg/L levamisol +10mg/L mebendazol	Banho: 24 h	Onaka (2001)
Linguadactyloides sp.	250 mg/L formol	Banho:30-60min	Ceccarelli et al. (1993)
Microcotyle sp.	400 mg/L formol	Banho: 60 min	Katharios et al. (2006)
Zeuxapta seriolae	300 mg/L H_2O_2	Banho: 10 min	Mansell et al. (2005)
A. penilabiatus	7 mg/L paration	Banho:16-24 h	Cruz et al. (2008)

Estudos em *P. mesopotamicus* com dactilogirose demonstram que banhos com cloreto de sódio (NaCl) a 22,8%, durante 10 minutos, foi eficiente no tratamento, enquanto dosagens a partir de 55,0% mostraram-se letais para os peixes, pois os animais apresentaram hemorragia branquial, desprendimento das mucosas e opacidade da córnea (Ceccarelli & Oliveira, 1986). Em pirarucu *Arapaima gigas*, banhos com NaCl a 2% ou 4,0% por 20 min foram pouco efetivos no tratamento para *Dawestrema* sp. e causou grande mortalidade nos peixes (Cavero *et al*., 2002). Porém, em *O. niloticus* banhos de 10 minutos com 3 g/L de cloreto de sódio ou 250 mg/L de formol reduziram o número de *Gyrodactylus* sp., mas não de *Dactylogyrus* sp. (Vargas et al., 2003), enquanto tratamentos com 2,5-3,4 g/L de sal para oncomiracídios de *Pseudodactylogirus anguillae* e *P. bini* foram efetivos (Umeda et al., 2006). Estes resultados sugerem que o sal tem pouco efeito no tratamento de monogenóides adultos, mas pode eliminar oncomiracídios.

Em *P. mesopotamicus* jovens parasitados com adultos de *Linguadactyloides* sp., com banhos de 0,025% formol por 30 ou 60 minutos, foram eficazes (Ceccarelli et al., 1993). Por outro lado, banhos com 25 mg/L de formol, durante 10,5 horas foram pouco efeitos na eliminação de *Haliotrema abaddon*, das brânquias de *G. hebraicum* (Stephens et al., 2003). Porém, concentrações mais elevadas de formol (250-300 mg/L) também não matam 100% desta e de outras espécies de monogenóides marinhos e ainda podem ser tóxicas para os peixes.

Em G. hebraicum, exposto a 15 mg/L de triclorfon, por duas horas, para tratamento de *H.* abaddon houve elevada toxicidade sem eliminação do parasito (Stephens et al., 2003). Similarmente, triclorfon em concentrações de 0,2; 0,5 e 1,0 mg/L, em única aplicação, teve pouco efeito em

oncomiracídios de *P. anguillae* e *P. bini*. Porém, permanganato de potássio e cloramina-T eliminam os oncomiracídios, mas não seus ovos. Assim, é necessário tratamento durante vários dias seguidos para eliminar esses parasitos, quando qualquer um desses três produtos é usado contra monogenóides (Umeda et al., 2006). Para enguias *Anguilla anguilla* infectadas por monogenóides, concentrações terapêuticas de permanganato de potássio e cloramina-T foram altamente tóxicas (Madsen et al., 2000). Similarmente, na Austrália, para eliminar monogenóides de *Seriola lalandi*, comumente tem sido usado 300 mg/L de peróxido de hidrogênio, mas este produto é estressante para esse peixe (Mansell et al., 2005), bem como para outras espécies, dependendo da espécie, concentrações usadas e da temperatura.

Métodos terapêuticos alternativos também têm sido testados para eliminar monogenóides. Hirazawa et al. (2001) relata que 1 mM de ácido de caprilico eliminou oncomiracídeos e adultos de *Benedenia seriolae*, *in vitro*. Em *P. mesopotamicus*, o uso de 2000 mg de alho/kg de ração, por 15 dias, reduziu em até 50,0% a quantidade de *A. penilabiatus* nas brânquias dos peixes parasitados (Martins et al., 2002b). Neste mesmo hospedeiro, tratamento 2,9 mg/L de extrato aquoso de folhas de nim (*Azadirachta indica*), por 120 horas, eliminou 89,2% dos monogenóides *A. penilabiatus* nas brânquias dos peixes (Cruz et al., 2008).

Extrato de santa-bárbara ou paraíso (*Melia azedarach*) tem sido testado com sucesso para tratar monogenóides de peixe marinho no Brasil (Osoria, 2003). Recentemente, Valentim-Zabott et al. (2008) relataram que o uso de um complexo homeopático (Homeopatila RS©) na ração de pós-larvas de *O. niloticus* eliminou os pasitos *Gyrodactilus* e *Trichodina* sp.

Nematóides

Levantamentos recentes indicam que existem inúmeras espécies de nematóides, os quais podem ser encontrados em peixes dulciaquícolas no Brasil (Vicente & Pinto, 1999; Onaka, 2009). Os nematóides adultos podem viver tanto no trato digestório como nas cavidades corporais do hospedeiro. A fertilização é interna, pela inserção dos espículos do macho na vagina da fêmea. Os machos geralmente possuem papilas e uma bolsa ou ventosa genital para se copular com as fêmeas, e dependendo da espécie as fêmeas são ovíparas ou vivíparas. Apresentam quatro estágios larvais antes de atingir a fase adulta e, no caso dos parasitos de peixes, o primeiro estágio larval é livre na água e os demais estágios são parasitários.

Os danos causados ao hospedeiro dependem da espécie do nematóide, do órgão invadido e do número de parasitos (Thatcher & Neto, 1994; Onaka, 2009). As infecções por nematóides retardam o crescimento dos peixes e causam grave patogenia (Prieto et al., 2005), e até mesmo a morte; situações indesejáveis em uma piscicultura. Infecção hepática causada por *Neocucullanus neocucullanus*, pode causar perfuração no estroma do órgão, desorganização tecidual e grave processo inflamatório nos peixes infectados (Rodrigues et al., 2002). Contudo, *Rodonia rondoni* são parasitos freqüentemente encontrados em grande número no trato digestório de peixes, mas parecem não causar prejuízos à saúde dos peixes infectados (Cecarelli et al., 1990; Martins & Urbinati, 1993; Dias et al., 2004),

independente da quantidade de parasitos no hospedeiro (Martins & Urbinati, 1993).

Nematóides com cutícula espinhosa penetram na mucosa gastrointestinal causando hemorragias e severa reação inflamatória, como é o caso do *Goezia leporini* (Anisakidae) encontrado parasitando o trato digestório de *Leporinus macrocephalus* de criação. Este parasito causou grave anemia, com redução do hematócrito e concentração de hemoglobina, além de anisocitose e poiquilocitose, devido às ulcerações hemorrágicas provocadas no hospedeiro (Tavares-Dias & Moraes, 2004; Martins et al., 2004).

Os parasitos nematóides podem ter ou não especificidade, sendo que um não específico pode utilizar um vasto número de espécies de hospedeiros distinto (Pavanelli et al., 2000). Por exemplo, *R. rondoni* comumente encontrado em pacu *P. mesopotamicus*, também tem sido descrito em várias outras espécies de peixes (Parra et al., 1997), e tratamento com 20 ou 40 mg de fembendazol/kg de ração não foi eficaz no tratamento deste nematóides neste peixe (Parra et al., 1997).

Há poucos estudos sobre tratamentos contra nematóides. Porém, para espécies encontradas no Brasil estes são quase inexistente, pois o tratamento contra nematóides é difícil, principalmente, em pisciculturas. Contudo, o ciclo de vida desses parasitos pode ser interrompido com tratamentos de 0,5-1,0 mg/L de dipterex (Tonguthai, 1997).

Em recente revisão, Prieto et al. (2005) relataram que diversas substâncias medicinais têm sido usadas com sucesso no tratamento contra vários nematóides, em Cuba e no México. Sementes de papaia (*C. papaya*) têm efetividade contra *Cucullanus* sp., parasitando tilápias. Tratamento único com de 200 mg/L de alho (*A. sativum*) ou cebola (*Allium cepa*) mostraram bons resultados no tratamentos contra *Capillaria* sp. e *Spirocamallanus* sp., em tilápias e carpas. Similarmente, a castanha (*Castanea sativa*) quando moída e diluída água foi também um bom anti-helmintíco contra *Capillaria* sp. e *Spirocamallanus* sp. Tratamento em única dose de 10 g/L com erva-de-Santa-Maria (*Chenopodium ambrosioides*), também eliminou 92% dos ovos de nematóides. Portanto, como estas espécies de nematóides também parasitam são encontrados no Brasil, bem como as plantas com princípios farmacologicamente ativos, assim estas poderão ser usadas na piscicultura. Contudo, são necessários estudos mais detalhados sobre as concentrações efetivas contra cada espécie de nematóide, como também sobre a toxicidade da erva-de-Santa-Maria para os peixes.

Considerações finais

No Brasil, há falta de informações sobre os cuidados adequados para impedir a invasão dos patógenos na criação. Assim, produtores não incluem a construção de quarentenários e não exige certificação sanitária de doenças nos peixes que adquirem. Consequentemente, pode ocorrer então uma disseminação de agentes, potencialmente, perigosos na piscicultura. Na tentativa de minimizar os prejuízos causados pelas enfermidades, têm sido utilizados vários produtos terapêuticos. No entanto, muitas vezes estes produtos também apresentam resultados, geralmente, prejudiciais à produção. Estes resultados ocorrem quando é feito de forma indiscriminada o

uso dos produtos, com cálculos errôneos da quantidade de aquisição e uso. Além disso, não é respeitado o tempo de carência para consumo dos peixes tratados com estes produtos, e por fim desistem da atividade.

Outro fato preocupante é que, atualmente no Brasil, tem sido registrado e liberado a utilização de produtos químicos, por os órgãos responsáveis pela fiscalização do uso destes produtos na aquicultura, os quais normalmente têm causado efeitos adversos aos prescritos para seu uso no controle de enfermidades em peixes. Portanto, estes produtos não deveriam ser liberados sem comprovada eficácia e segurança, uma vez que os produtores usam estas substâncias de efetividade duvidosa, sem conhecimento. Consequentemente se caminha na direção contrária do desenvolvimento da atividade economicamente relevante, pois devem ser usados produtos que comprovadamente causam benefícios aos peixes sem danificar meio ambiente e, consequentemente, auxilie o produtor a ter lucros com a atividade.

Contudo, alguns cuidados simples podem determinar a uma maior sobrevivência dos peixes e aumento da produção, garantindo assim maior lucro para o produtor – o respeito à capacidade-suporte dos tanques/viveiros da piscicultura, a não exposição desnecessária dos peixes a situações estressantes, manutenção de uma boa entrada de água com qualidade nos tanques/viveiros, além de evitar a entrada de agentes patogênicos. Consequentemente, o produtor poderá obter um produto final de melhor qualidade, o que é fundamental para incremento da cadeia do pescado.

Referências

AFFONSO, E. G.; BARROS, F. P.; BRASIL, E. M; TAVARES-DIAS, M.; ONO, E. A. 2009. Indicadores fisiológicos de estresse em peixes expostos ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2). In: TAVARES-DIAS, M. (Org). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá, p. 346-360.

ALCÂNTARA-ROCHA, R. C. G.; CECCARELLI, P. S.; MELO, J. S. C.; SOUZA-FILHO, V. M. 1993. Eficiência de produtos químicos no combate a infestação do parasito *Trichodina* sp em lambari, *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758). *Bol. Téc. Cepta*, 6: 31-39.

ALCÂNTARA-ROCHA, R. C. G.; CECCARELLI, P. S.; SANTOS NETO, J. C.; RODRIGUES, A.; CERVI, R. C.; RIBEIRO, P. 1994. Eficácia de diferentes produtos químicos no controle de *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876, em alevinos de pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887. *B. Téc. Cepta*, 7:1-8,1994.

ALEXANDRINO, A. C.; OKUMURA, M. P. M.; BALDASSI, L.; TABATA, Y. A.; PAULI, A. O. S.; ARAÚJO, A. P. ROSA, M. B. 1998/1999. Ocorrência de infecção por *Edwardsiella tarda* em trutas-arco íris (*Oncorhynchus mykiss*) em cultivo intensivo. *B. Inst. Pesca*, 25: 121-123.

ANDRADE, L. S.; ANDRADE, R. L. B; BECKER, A. G. 2006. Survival and behavior of silver, *Rhamdia quelen*, submitted to antibiotics and sodium chloride treatments. *Ciên. Rural*, 36: 1004-1007.

ARAÚJO, L. D.; CHAGAS, E. C.; GOMES, L. C.; BRANDÃO, F.R. 2004. Efeito de banhos terapêuticos com formalina sobre indicadores de estresse em tambaqui. *Pesq. agrop. bras.*, 39: 217-221.

AVENDAÑO-HERRERA, R.; MAGARIÑOS, B.; IRGANG, R.; TORANZO, A. E. 2006. Use of hydrogen peroxide against the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* and its effect on infected turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 257: 104-110.

BUCHMANN, K.; BJERREGAARD, J. 1990. Comparative eficacies of commercially available benzimidazoles against *Pseudodactylogyrus* infestations in eels. *Dis. Aqua. Org.*, 9:117-120.

CARNEIRO, P. C. F.; SCHORER, M.; MIKOS, J. D. 2005. Tratamentos terapêuticos convencionais no controle do ectoparasita *Ichthyophtirius multifiliis* em jundiá (*Rhamdia quelen)*. *Pesq. agrop. bras.*, 40: 99-102.

CARNEVIA, D.; CHAVES, L.; KEREKI, C. F. 2003. Caracterización de siete cepas de *Aeromonas hydrophila* (Bactéria, Aeromonadaceae) aisladas de peces ornamentales tropicales de Uruguay. CIVA2003, p. 966-970. [Disponível em: www. revistaaquatic.com/civa2003].

CASTRO, F. J.; FERNANDES, M. N. 2009. Efeitos da infestação por parasitos argulídeos na fisiologia e mecanismos de defesa inata em peixes cultivados. In: TAVARES-DIAS, M. (Org). Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá: Embrapa Amapá, p. 361-388.

CASTRO, S. B. R.; LEAL, C. A. G. ; CARVALHO, D. A. ; OLIVEIRA, D. F.; FIGUEIREDO, H. C. P. Antibacterial activity of plant extracts from Brazil against fish pathogenic bacteria. *Braz. J. Microbiol*., 39: 1-4, 2008.

CAVERO, B. A. S.; ITUASSU, D. R.; PEREIRA FILHO, M.; CRESCÊNCIO, R.; GANDRA, A. L.; ROUBACH, R. 2002. In: *XII Simpósio Brasileiro de Aquicultura*, Goiânia, 2002, p. 1-14.

CECCARELLI, P. S. 1988. Susceptibilidade à infestação por *Lerneae* (Copepoda: Lerneidae) Linnaeus em diferentes espécies de peixes cultivados no CEPTA e testes de infestação no pacu *Piaractus mesopotamicus* em laboratório. *Bol. Téc. Cepta*, 1:31-35.

CECCARELLI, P. S. OLIVEIRA, C. A. 1986. Ocorrências de helmintos, parasitas de *Colossoma mitrei* Berg, 1984 em ambiente natural. Simpósio Brasileiro de Aquicultura, 5., Cuiabá, 1986. *Anais*...p.203-205,.

CECCARELLI, P. S.; ALCÂNTARA ROCHA, R. C. G.; MELO, J. S. C. E. 1993. Efeito do formaldeído sobre a *Trichodina* sp. e *Linguadactyloides* sp. em alevinos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887. *Bol. Téc. Cepta*, 6: 23-30.

COSTA, A. B. 2004. Estratégias para o estudo de bactérias potencialmente patogênicas na piscicultura. In: In*: Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. Cyrino et al. (Ed.). São Paulo: TecArt. p. 387-403.

CRUZ, C.; MACHADO NETO, J. G.; FUJIMOTO, R. Y.; HENARES, M. N. P.; DUÓ, D. A. 2008. Eficácia do paration metílico e do extrato aquoso de folhas secas de nim no controle de *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenoidea) em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *B. Inst. Pesca*, 34: 61 – 69.

DARWISH, A. M.; MITCHELL, A. J.; STRAUS, D. L. 2009. Evaluation of potassium permanganate against an experimental subacute infection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Dis*., 32:193–199.

DIAS, P.G.; FURUYA, W.M.; PAVANELLI, G.C.; MACHADO, M.H. & TAKEMOTO, R.M. 2004. Carga parasitária de *Rondonia rondoni* Travassos, 1920

(Nematoda, Atrictidae) e fator de condição do armado, *Pterodoras granulosus* Valenciennes, 1833 (Pisces, Doradidae). *Acta Scientiarum*, 26: 151-156.

DIGGLES, B.K. 2000. Chemotherapy of the ciliate *Trichodina* sp., on juvenile turbot (*Colistium nudipinnis*) with notes on the susceptibility of fish with abnormal pigmentation. *New Zealand J. Mar. Freshwater Res.*, 34: 645-652.

DOBSON, A. P.; KEYMER, A. E. 1994. Population dynamics and community structure of parasite helminths. In: SHORROCKS, B.; SWINGLAND, L. A. *Living in a patchy environment.* Oxford: Oxford University Press, p. 107-125.

DOBSON, A.P.; ROBERTS, M. 1990. The population dynamics of parasite helminth communities. *Parasitology,* 109: S97- S108.

EKANEM, A. P; OBIEKEZIE, A.; KLOAS, W.; KNOPF, K.2004. Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabacea) and *Carica papaya* (Caricacea) against the protozoan fish parasite *Ichthyophtirius multifiliis*. *Parasitol. Res*., 92: 361-366.

GIESEKER, C. M.; SERFLING, S. G.; REIMSCHUESSEL, R. 2006. Formalin treatment to reduce mortality associated with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 253: 120-129.

GODOY, D.; MIAN, G.; ZANOLO, R.; YUHARA, T.; FARIA, F.; FIGUEIREDO, H. C. P. 2008. Patterns of resistance to florfenicol and bicyclomycin in Brazilian strains of motile aeromonads. *Aquaculture*, 258:255-259.

HIRAZAWA, N.; OSHIMA, S.; HATA, K. 2001. In vitro of the antiparasitic effect of caprylic acid against several fish parasites. *Aquaculture*, 200: 251-258.

JOHNSON, S. C.; CONSTIBLE, J. M.; RICHARD, J. 1993. Laboratory investigations on the efficacy of hydrogen peroxide against the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and its toxicological and histopathological effects on Atlantic salmon *Salmo salar* and chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha. Dis. Aquat. Org*., 17:197-204.

JIANG, Y.; XIE, P.; LIANG, G. 2009. Distribution and depuration of the potentially carcinogenic malachite green in tissues of three freshwater farmed Chinese fish with different food habits. *Aquaculture*, 288:1-6.

KATHARIOS, P.; PAPANDROULAKIS, N.; DIVANACH, P. 2006. Treatment of *Microcotyle* sp. (Monogenea) on the gills of cage-cultured red porgy, *Pagrus pagrus* following baths with formalin and medendazole. *Aquaculture*, 251: 167-171.

KLEIN, S; FEIDEN, A.; BOSCOLO, W. R.; REIDEL, A.; SIGNOR, A.; A. SIGNOR, A. A. 2004. Utilização de produtos químicos no controle de *Ichthyophthiriusmultifiliis,* Fouquet (1876) em alevinos de surubim do Iguaçu *Steindachneridion sp.,* Garavello (1991). *Semina: Ciên. Agr*., 25: 51-58.

LI, MH.; WISE, D. J; ROBINSON, E. H. 1996. Chemical prevetion and treatment of winter saprolegnioseis (“winter kill”) in channel catfish *Ictaclurus punctatus*. J. *Word Aquacult. Soc*., 27:1-6.

LIMA, R. M. S.; FIGUEIREDO, H. C. P; FARIA, F. C. F; PICOLLI, R. H; BUENO FILHO, J. S. S; LOGATO, P. V. R. 2006. Resistência a antimicrobianos de bactérias oriundas de ambiente de criação e filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus)*. *Ciênc. agrotec*., 30:126-132.

LOM, J. 1981. Fish invading dinoflagellates: a synopsis of existing and newly proposed genera. *Folia Parasitol.*, 28:3-11.

MADSEN, H. C. K.; BUCHMANN, K.; MELLERGAARD, S. 2000. Treatment of trichodiniasis in eel (*Anguilla anguilla*) reared in recirculation systems in Denmark: alternatives to formaldehyde. *Aquaculture*, 186: 221-231.

MANSELL, B.; POWELL, M. D.; ERNST, I.; NOWAK, B. F. 2005. Effects of the gill monogenean *Zeuxapta seriolae* (Meserve, 1938) and treatment with hydrogen peroxide on pathophysiology of kingfish, *Seriol ialandi* Valenciennes, 1833). *J. Fish Dis.*, 28: 253-262.

MARTINS, M. L.; ONAKA, E. M.; MORAES, F. R.; FUJIMOTO, R. Y. 2001. Mebendazole treatment against *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea, Dactylogyridae) gill parasite of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes, Characidae) in Brazil. Efficacy and hematology. *Acta Parasitol.*, 46: 332-336.

MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; BOZZO, F. R.; PAIVA, A. M. F. C.; GONÇALVES, A. 2002a. Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the state of São Paulo, Brazil. *Acta Scientiarum*, 24: 981-985.

MARTINS, M.L.; MORAES, F. R.;MIYAZAKI, D. M. Y.; BRUM, C. D.; ONAKA, E. M.; FENERICK, J.; BOZZO, F. R. 2002b. Alternative treatment for *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae) infection in cultivated pacu *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) in Brazil and their haematological effects. *Parasite*, 9: 175-180.

MARTINS, M. L.; YOSHITOSHI, E. R. 2003. A new nematode species *Goezia leporini* n. sp. (Anisakidae) from cultured freshwater fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae) in Brazil. *Braz. J. Biol.*, 63: 497-506.

MIRON, D. S.; SILVA, L. V. F.; GOLOMBIESKI, J. I.; BALDISSEROTTO, B. 2003. Efficacy of different salt (NaCl) concentrations in the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* in infected silver catfish *Rhamdia quelen,* fingerlings. *J. Appl. Aquacul.*, 14: 155-161.

MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. 2004. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In*: Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. Cyrino et al. (Ed.). São Paulo: TecArt. p. 343-386.

MURATORI, M. C.; MARTINS, N. E.; PEIXOTO, M. T. D.; ARARIPE, M. N. B.; MENDONÇA, I. L. 2000. Ocorrência de *Piscinoodinium pillulare* em tilápia *Oreochromis niloticus*. In: Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos, 6 e Encontro Latino-Americano de Patologistas de Organismos Aquáticos, 2., 2000, Florianópolis, SC. Anais...p.117.

MURATORI, M. C. S.; MARTINS, N. E.; PEIXOTO, M. T. D.; OLIVEIRA, A. L., RIBEIRO, L. P.; COSTA, A. P. R.; SILVA, M. C. C.; LEITE, R. C. 2001. Mortalidade por “septicemia dos peixes tropicais” em tilápias criadas em consorciação com suínos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. ,* 53:658-662.

NUÑEZ, M.; POZO, M.; VALLADARES, J. 2001. Concentración inhibitoria mínima de tres extractos de plantas medicinales sobre bacterias del género *Aeromonas*, causantes de enfermidade en peces. Rev. AquaTic, 14: [*Disponible el 16/05/2009 en URL: http://www. revistaaquatic.com/ aquatic/art.asp?t=h&c=123*].

ONAKA, E. M. 2009. Principais parasitoses em peixes de água doce no Brasil. In: TAVARES-DIAS, M. (Org). Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá: Embrapa Amapá, p. 536-574.

OSORIA, R. A. F. 2003. Evaluación de extratos de plantas medicinales com actividad antiparasitaria. CIVA 2003, p.358-370 [Disponível em: www. revistaaquatic.com/civa2003].

OMOREGIE, E.; ESEYIN, T. G.; OFOJEKWU, P. C. 1994. Chronic effects of formalin on erythrocytes counts and plasma glucose of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Asian Fish. Sci.*, 7: 1-6.

OMOREGIE, E.; OYEBANJI, S. M. 2002. Oxytetracycline-induced blood disorder in juvenile Nile tilapia Oreochromis *niloticus* (Trewavas). *J. World Aquacul. Soc.*, 33: 377-382.

PARRA, J. R. G; BRANDÃO, D. A.; CECCARELLI, P. S. 1997. Eficácia do fembendazole no controle de nematódeos de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1987). *Ciên. Rural*, 27: 297-299

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. 2000. Sanidade de Peixes. *Inform. Agrop.*, 21:48-52.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C. TAKEMOTO, R.M. 2008. *Doenças de peixes: Profilaxia, diagnóstico e tratamento*. 3ª Ed. Maringá: UEM.

PELLLI, A.; PAULA, D. R.; ARRUDA, A. A. M.; LOPES, P.M.; RAMOS, S.M.; REZENDE, A.P.S. 2008. Toxicidade aguda e crônica de difloebnzuron para jaú, *Zungaro zungaro* (Hunboldt, 1821)(Pisces, Pimelodidae). *Rev. Bras. Zoociên.*, 10: 51-54.

PIRONET, F. N.; JONES, J. B. 2000. Treatments for ectoparasites and diseases in captive Western Australian huffish. *Aquacul. Internat.*, 8: 349-361.

PRIETO, A.; OCAMPO, A. A.; FERNÁNDEZ, A.; PÉREZ, M. B. 2005. El empleo del medicina natural en el control de enfermedades de organismos acuáticos y potencialidades de uso en Cuba y México. *Rev. Especial. Cien. Químico Biológ.*, 8:38-49.

RANZANI-PAIVA, M. J.; ISHIKAWA, C. M.; PORTELLA, M. C.; CELIBERTO, R. J. 1987. Hematologia da carpa comum *Cyprinus carpio*, infestada por *Argulus* sp. e após um tratamento com fosfato de 0,0-dimetil-oxi-2,2,2,-tricloroetilo (Neguvon). *B. Inst. Pesca*, 14: 83-92.

RODRIGUES, E. L.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SANTOS, A. A. Alterações histopatológicas em fígado de dourado *Salminus maxilosus* Valenciennes, 1840 (Osteichthyes, Characidae) causadas por *Neocucullanus neocucullanus* Travassos, Artigas & Pereira 1828 (Nematoda). *Acta Scientiarum*, 24: 455-459, 2002.

SAHU, S.; DAS, B. K.; MISHRA, B. K.; PRADHAN, J.; SARANGI, N. 2007. Effect of *Allium sativum* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *J. Appl. Ichthyol.*, 23: 80-86.

SANCHEZ, W.; PALLUEL, O.; MEUNIER, L.; COQUERY, M.; PORCHER, J. M.; AÏSSA, S. A. 2005. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environ.l Toxicol. Pharmacol.*, 19: 177-183.

SCHAMAHL, G.; SCHIMIDT, H.; RITTER, G. 1996. The control ichthyophthiriasis by a medicated food containing quinine: efficacy tests and ultrastructure investigations. *Parasito. Res.*, 82: 697-75.

SCHLENK, D. 1998. Efficacy of copper sulfate for the treatment of ichthyophthiriasis in channel catfish. *J. Aquatic Anim. Health*, 10: 390-396.

SCHRECK, C. B.;FITZPATRICK, M. S.; MARKING, L. L.; RACH, J. J.; SCHREIER, T. M. 1992. *National Fisheries Research Center, Research to Identify Effective Antifungal Agents*. Annual Report, to Bonneville Power Administration, Portland, OR.

SHALABY A. M.; KHATTAB, Y. A.; ABDEL RAHMAN, A. M. 2006. Effects of garlic (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 12:172-201.

SHAMSUDIN, M. N.; PLUMB, J. A. 1994. Morphological, biochemical, and physiological characterization of *Flexibacter columnaris* isolates from four species of fish. *J. Aquatic Anim. Health*, 8: 335-339.

SPEARSE, D. J.; ARSENAULT, G. J. 1997. Effects of intermittent hydrogen peroxide exposure on growth and columnaris disease prevention of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Aqua. Sc.*, 54: 2653-2658.

SINGHAL, R. N.; JEET, S.; DAVIES, R. W. 1986. Chemotherapy of six ectoparasitic diseases of cultured fish. *Aquaculture*, 54:165-171.

SORUM, H. 1999. Antibiotic resistance in aquaculture. *Acta Vet. Scandinavia*, 92: 29-36.

SOUSA, J. A.; EIRAS, J. C.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; Alexandrino, A. C. 1999. Bacteriology of wild grey mullets, *Mugil platanus* Günther, from Cananéia, São Paulo State, Brazil. *Revta bras. Zool.*, 16: 1065-1069.

STEPHENS, F. J.; CLEARY, J. J.; JENKINS, G.; JONES, J. B.; RAIDAL, S. R.; THOMAS, J. B. 2003. Treatment to control *Haliotrema abaddon* in the West Australian dhufish, *Glaucosoma hebraicum*. *Aquaculture*, 215: 1-10.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; KRONKA, S. N. 1999. Evaluation of the haematological parameters in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes: Characidae) with *Argulus* sp (Crustacea, Branchiura) infestation and treatment with organophosphate. *Revta. bras. Zool.*, 16: 553-555.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; SCHALCH, S. H. C.; ONAKA, E. M.; MORAES, J. R. E.; QUINTANA, C. I. F.;MORAES, F. R. 2002. Alterações hematológicas e histopatológica em pacus *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887(Osteichthyes: Characidae) tratatos com sulfato de cobre(CuSO4). *Acta Scientiarum*, 24:547-554.

THATCHER, V. E.; BRITES-NETO, J. 1994. Diagnósitco, prevenção e tratamento das enfermidades de peixes neotropicais de água doce. *R. Bras. Med. Vet.*, 16: 111-128.

THOMAS-JINU, S.; GOODWIN, A. E. 2004. Acute columnaris infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque): efficacy of practical treatments for warmwater aquaculture ponds. *J. Fish Dis.*, 27: 23-28.

TOJO, J.; SANTAMARINA, M. T.; UBEIRA, F. M.; ESTEVEZ, J.; SANMARTIN, M. L. 1992. Anthelmintic activity of benzimidazoles against *Gyrodactylus* sp. infecting rainbow trout *Oncorynchus mykiss. Dis. Aqua. Org.*, 12: 185-189.

TONGUTHAI, K. 1997. Control of freshwater fish parasites: A Southeast Asian perspective. *Inter. J. Parasitol.*, 27: 1185-1191.

TÓRO, R. M.; GESSNER, A. A. L.; FURTADO, N. A. J. C.; CECCARELLI, P. S.; ALBUQUERQUE, S.; BASTOS, J. K. 2003. Activity of the *Pinus elliottii* resin

compounds against *Lernaea cyprinacea* in vitro. *Vet. Parasitol*., 118: 143-149.

UMEDA, N.; NIBE, H.; HARA, T.; HIRAZAWA, N. 2006. Effects of various treatments on harching of eggs and viability of oncomiracidia of the monogenean *Pseudodactylogyrus anguillae* and *Pseudodactylogyrus bini*. *Aquaculture*, 253: 148-153.

VALENTIM-ZABOTT, M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P. R.; PIAU JUNIOR, R.; TORRES, M. B. A.; RÖNNAU, M.; SOUZA. J. C. 2008. Effects of a homeopathic complex in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) on performance, sexual proportion and histology. *Homeopathy*, 97:190–195.

VARGAS, L.; POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P.; MOREIRA, H. L. M.; LOURES, B. T. R. R; MARONEZE, M. S. 2003. Efeito do tratamento com cloreto de sódio e formalina na ocorrência de ectoparasitas em alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) revertidos sexualmente. Arq. *Ciên. Vet. Zool.*, 6: 39-48.

VICENTE, J. J.; PINTO, R. M. 1999. Nematóides do Brasil. Nematóides de peixes. Atualiazação: 1985-1998. *Revta bras. Zool*., 16: 561-610.

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 23

Histologia: ferramenta relevante para estudos em peixes cultivados

Fabiana Cavichiolo

Resumo

Em sistemas aquícolas as situações de estresse são bastante comuns, seja devido às variáveis naturais tais como as condições ambientais e climáticas, ou mesmo em sistemas controlados. Este fato, em muitos casos, resulta em consequências negativas para a produção de peixes, tais como: redução no desempenho, aparecimento de doenças e até alterações morfológicas que comprometem estruturas teciduais vitais dos peixes. Porém, para que estas alterações morfológicas sejam refletidas em lesões macroscópicas demanda muito tempo. Contudo, se o material for submetido a estudo microscópico pode se chegar a um diagnóstico prévio. Estas alterações histológicas funcionam como mecanismos de defesa. Assim, a histopatologia pode ser uma excelente ferramenta com o propósito de monitoramento e diagnóstico de alterações nos tecidos, bem como de suas possíveis correlações com o desempenho dos peixes.

Abstract

In aquaculture systems stress is so common, either must the natural variable as ambient or weather conditions, as in controlled systems. This fact in most cases results in clinical consequences such as: low performance, diseases, and also morphologic changes, which implicates vital tissues for fish. However to be reflected in macroscopic injuries can take a long time. But if the material was submit to microscopical studies can be arrived at a previous diagnosis, these histology alterations functions as defense mechanisms. In such a way the histopathology starts to be an excellent tool with the monitoring intention and tissue alterations diagnostic, as well as of its correlations with the performance of the fish.

Introdução

Nos ambientes aquáticos os animais pode estar naturalmente submetidos a algum tipo de estresse causados por variáveis naturais como condições ambientais e climáticas. Porém, isso ocorre com maior frequência nos sistemas aquícolas, mesmo quando controlados, nesse caso o estresse é em decorrência de alguma deficiência de adaptação ou manejo incorreto. Estes fatores contribuem para uma possível depressão do sistema imunológico com consequências negativas no desempenho zootécnico como redução no desempenho, bem como alterações patológicas relacionadas a doenças e até mesmo alterações de ordem morfológica. Essa última alteração compromete as estruturas funcionais, interferindo em suas funções normais, afetando assim diretamente a saúde dos peixes, seja qual for a espécie ou fase de seu desenvolvimento. Na maioria das vezes, as lesões macroscópicas graves nesses órgãos demoram a aparecer.

Em geral, as alterações patológicas podem ser: distúrbios circulatórios, alterações regressivas, alterações progressivas, inflamações e tumores. Os distúrbios circulatórios são alterações patológicas do sangue ou vasos sanguíneos, resultando em sinais de hemorragia, hiperemia, congestão e extravasamento sanguíneo. As alterações regressivas são demonstradas por hipofunção celular e/ou tecidual, atrofia, degeneração e necrose. As alterações progressivas são aquelas causadas por hiperplasia e hipertrofia celular e/ou tecidual. As inflamações representam uma reação de proteção e defesa do organismo das células imunes a um patógeno e estímulo químico ou físico. Tumores são alterações originadas por proliferação autônoma de células e/ou tecidos

Anteriormente, a histologia animal visava, primeiramente, esclarecimentos sobre a morfologia microscópica do corpo dos animais. Atualmente, o maior propósito desta técnica é esclarecer o funcionamento dos tecidos, quanto às células e suas correlações, para que a histopatologia possa ser usada como uma ferramenta no diagnóstico de doenças, através do uso desses conhecimentos na compreensão das alterações patológicas teciduais, ao longo de suas categorias.

Porém, para que haja uma melhor interpretação dos resultados, é imprescindível que antes se tenha um bom conhecimento de estruturas normais, alterações que possam ocorrer e variações sazonais normalmente nos mais diversos órgãos dos peixes. É uma ferramenta ainda de pouco uso na aquicultura, devido à escassez de informações, pois estas se encontram dispersas. Assim, o objetivo deste capítulo foi reunir informações, relatos de caso, experimentos em que tenha sido utilizada esta técnica como ferramenta avaliativa, para que se possa direcionar e auxiliar estudos futuros. Pois as estruturas histológicas dos tecidos e órgãos dos peixes são, fundamentalmente, semelhantes à de outros vertebrados recentes. Entretanto, por serem vertebrados aquáticos, possuem algumas características morfo e fisiologicamente específicas, ausentes em animais terrestres, resultando em alguns tecidos diferenciados.

Características histológicas de órgãos

A - Brânquias

As brânquias são órgãos de vital importância para os peixes, assim ocupa o primeiro lugar entre os órgãos envolvidos na manutenção da saúde e metabolização de nutrientes, parâmetros-chave para o bom desenvolvimento destes animais. Este é o órgão responsável pelas trocas gasosas, processos de osmorregulação, equilíbrio ácido básico, transporte e excreção de compostos nitrogenados e ainda função sensorial na degustação. Ou seja, a sua multifuncionalidade, a vasta área de superfície que ocupa e a sua localização relativamente ao meio externo fazem das brânquias um órgão-chave para a ação dos poluentes existentes no meio aquático, assim qualquer alteração nesta estrutura causará um desequilíbrio orgânico comprometendo a sobrevivência e desempenho dos peixes (Morgan & Tovell, 1973), na piscicultura. Assim, as alterações histológicas das brânquias são reconhecidas como um método rápido e válido para determinar os danos causados pela exposição a diferentes irritantes nos peixes (Arellano et al., 1999; Cavichiolo et al., 2007).

A maior parte dos teleósteos possui cinco pares de arcos branquiais situados de cada lado da cavidade bucal conectados pelo septo interbranquial. Os arcos branquiais possuem suporte de cartilagem hialina e tecido ósseo, variando de acordo com a fase de desenvolvimento, associado a uma camada transversal de tecido muscular liso (Procópio et al., 2008) e revestido por epitélio mucoso que apresenta-se contínuo ao da faringe e cavidade bucal. Destes arcos partem uma fileira dupla de filamentos achatados dorso-ventralmente que se subdividem em lamelas branquiais que se encontram dispostas perpendicularmente, sendo sua organização geral baseada em um sistema de subdivisões sucessivas (Figura 1).

Na inserção dos filamentos há uma arteríola aferente juntamente a um feixe nervoso, uma linha de tecido muscular liso e um disco de cartilagem hialina em forma de meio círculo, emitindo prolongamento ao longo do filamento. Os filamentos possuem duas regiões mais dilatadas onde se localizam vasos aferentes e eferentes, a parte de inserção no arco e a região distal. As lamelas se inserem perpendicularmente nos filamentos, sendo menores nas duas extremidades e maiores na parte média diminuindo formando uma meia lua (Figura 1).

O epitélio branquial apresenta-se estratificado, sendo constituído por diversos tipos celulares, em particular, por três: as pavimentosas que aparecem em maior frequência e possuem função de trocas gasosas; as células cloreto responsáveis pela regulação iônica, equilíbrio ácido-base e excreção de metabólitos nitrogenados, e as células mucosas, responsáveis pela produção de muco, o qual possui função de lubrificação e bactericida (Evans, 1987; Evans et al., 2005; Monteiro et al., 2004).

As lamelas são constituídas centralmente, por um eixo vascular e por um epitélio composto por células pavimentosas de revestimento e indiferenciadas. São compartimentalizadas internamente pelas células pilares que suportam e delimitam o compartimento sanguíneo lamelar, onde passa o sangue, sendo externamente revestidas em sua maioria por células

pavimentosas e células cloreto. Já no epitélio do filamento encontram-se também as células mucosas (Figura 1).

O epitélio da brânquia é a principal superfície de contacto com o ambiente e constitui um importante alvo dos poluentes presentes na água, devido à sua extensa área superficial (Wong & Wong, 2000). Um bom conhecimento básico de sua estrutura histológica é de extrema importância no diagnóstico clínico, uma vez que alterações estruturais em seu epitélio são ótimos indicativos antecipados de problemas ocasionados pelo ambiente onde o peixe está inserido, bem como de instalação de processos infecciosos.

As alterações mais comuns encontradas nas brânquias dos peixes e previamente descritas são: elevação epitelial, que se trata de uma elevação ou destacamento do epitélio lamelar e ocorre como primeiro sinal de patologia; hiperplasia, proliferação de células do epitélio filamentar, a qual conduz, por vezes, à fusão parcial ou total das lamelas branquiais (Figura 2). Esse aumento do epitélio pode ser devido à proliferação de células de cloreto e de células indiferenciadas (Halver et al, 1975; Halver, 1979; Lim & Lovell, 1978; Dabrowski et al., 1990; Chaves de Martinez, 1991; Chavez-Sánches, 1994; Pratap & Wendelaar Bonga, 1993; Soliman et al, 1994; Martins, 1994; Merchie et al., 1997; Phromkunthong et al., 1997; Leonardo, 1999, Dang et al., 1999; Arellano et al., 2000; leonardo et al, 2000, Cavichiolo, 2001, Cavichiolo et al., 2000; Thophon et al., 2003; Vargas & Ribeiro, 2009).

Essas alterações histológicas funcionam como mecanismos de defesa, porque diminuem a área de superfície vulnerável da brânquia e/ou aumentam a barreira de difusão ao poluente (Karlsson-Norrgren et al., 1985; Erkmen & Kolankaya, 2000). Essas respostas dificultam o acesso do poluente ao sangue prejudicando, contudo, a realização de trocas gasosas (Mcdonald & Wood, 1993).

As dificuldades respiratórias podem também ser responsáveis pela indução da vasodilatação. Por sua vez, a vasodilatação do eixo vascular das lamelas conduz à ruptura das células pilar com perda da sua capacidade de suporte, levando ao aparecimento dos aneurismas lamelares, as telangectasias (Figura 2D), um extravasamento de sangue no interior da lamela (Halver et al., 1975; Halver, 1979; Lim & Lovell, 1978; Dabrowski et al., 1990; Chaves de Martinez, 1991; Chavez-Sánches, 1994; Pratap & Wendelaar Bonga, 1993; Soliman et al., 1994; Martins, 1994; Merchie et al., 1997; Phromkunthong et al., 1997; Leonardo, 1999, Dang et al., 1999; Arellano et al., 2000; Leonardo et al., 2000, Cavichiolo, 2001; Thophon et al., 2003; Cavichiolo et al., 2000; 2008)

Há relatos também de degeneração por necrose e apoptose das células do epitélio branquial, essencialmente, células de cloro e pavimentosas (Pratap & Wendelaar Bonga, 1993; Mazon et al., 2002) associados a efeito direto de poluentes como os metais pesados.

Segundo Mallatt (1985), uma das principais alterações estruturais nas brânquias causadas pela exposição aos metais pesados, consiste no aparecimento de edema nos epitélios lamelar e filamentar. Estas alterações também foram documentadas por Arellano et al. (2000) em peixes expostos a diferentes poluentes e por Garcia-Santos et al (2006) e Thophon et al. (2003), quando estudaram os efeitos do cádmio e observaram também outras alterações, tais como a fusão parcial ou total das lamelas branquiais.

Monteiro (2001) e Monteiro et al (2005) ao usar a exposição ao cobre obtiveram resultados similares em tilápia nilótica *Oreochromis niloticus.*

Alterações de degeneração por necrose e apoptose das células do epitélio branquial, essencialmente, células de cloreto e pavimentosas, também foram mencionadas em estudos de natureza ultraestrutural realizados em teleósteos submetidos a diferentes poluentes (Pratap & Wendelaar Bonga, 1993; Mazon et al., 2002).

Estudos desenvolvidos por Cavichiolo et al. (2000), em tilápia do Nilo *O. niloticus*, demonstraram que quando foi utilizado suplementação de vitamina C na ração em concentração de 300 mg/kg e, portanto acima dos níveis das rações comerciais, a ocorrência de alterações morfológicas nas brânquias diminuiu consideravelmente. Isso ocorreu devido à melhora do sistema imunológico nos peixes suplementados com esta vitamina na ração (Moraes & Moraes, 2009).

Assim, recentemente, em estudos de toxicologia, a análise das alterações histológicas branquiais em diferentes teleósteos tem sido amplamente empregada por diversos pesquisadores (Pratap & Wendelaar Bonga, 1993; Thophon et al., 2003; Cavichiolo et al., 2007). Porém, há tempos estes estudos são usados para avaliar os efeitos de parasitos nas brânquias, locais comumente parasitados por protozoários e metazoários, tais como as tricodinas e monogeneas (Figura 3), principalmente em peixes de cultivo.
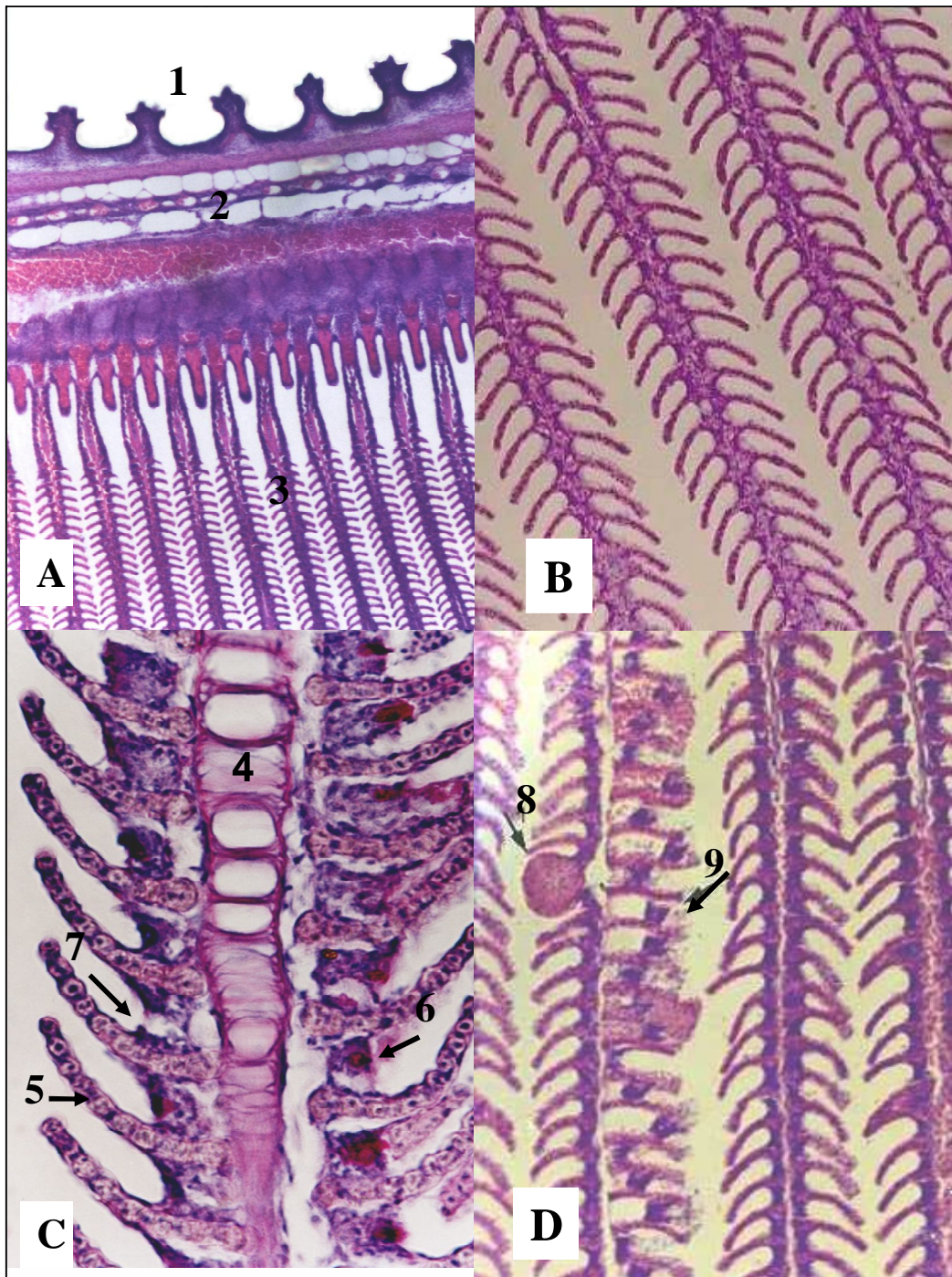
Figura 1. Cortes histológicos de brânquias de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*. (**A**) Visão geral (4X, alcian blue+PAS), onde: 1-rastros branquiais, 2- estrutura cartilaginosa, 3- filamentos branquiais. (B) estrutura normal (10X HE) e (**C**) (40X, alcian Blue+PAS). 4- suporte cartilaginoso, 5- epitélio respiratório, 6- célula mucosa, 7- espaço de passagem da água e (**D)** (20X, HE) 8 – Telangectasia, 9- elevação epitelial.
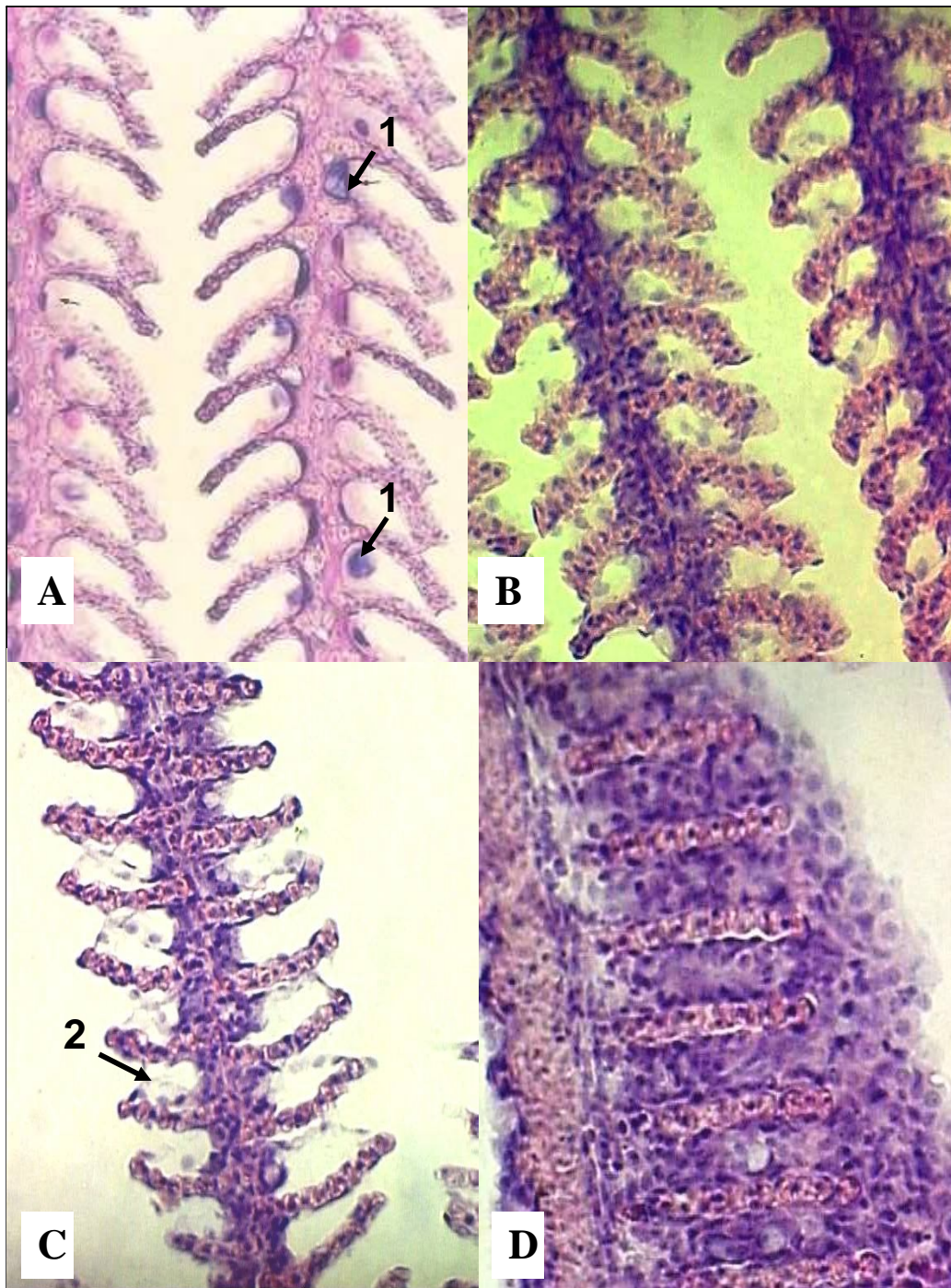
Figura 2. Cortes histológicos de brânquias de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*. (**A**) 1- células de muco (20X, alcian blue+PAS). (**B**) Fusão lamelar (30X, HE). (**C**) 2- elevação epitelial (30X, HE). (**D**) hiperplasia (40X, HE).

Figura 3. Cortes histológicos de brânquias de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* evidenciando a presença de parasitos *Trichodina sp*. (**A**) e Monogenoidea (**B**) (40X HE).

B - Fígado

O fígado não é somente o maior, mas também o mais versátil dos órgãos metabólicos, podendo ser considerado como ocupante de uma posição central no metabolismo do organismo (Harder, 1975; Junqueira & Carneiro, 1999). Pode desempenhar mais de 100 funções diferentes, sendo a maioria executada pelos hepatócitos, tais como: produção da bile, síntese de proteínas (albumina, fibrinogênio, protrombina), metabolismo de lipídios e carboidratos, metabolização de drogas, armazenamento das vitaminas A, D, B_{12} e K, função imune (Gartner & Hiatt, 2003). Este órgão é um dos locais mais ativos na metabolização e tentativa de neutralização dos efeitos de praticamente todos os poluentes químicos ou metabólicos.

Tem como responsabilidade, adaptar e preparar substâncias nutritivas que são ressorvidas pelo intestino às exigências do corpo do usuário, e neutralizar e eliminar substâncias tóxicas (Harder, 1975; Junqueira & Carneiro, 1999). Todos os componentes prejudiciais devem ser desintoxificados a fim de prevenir sua penetração no corpo. Em todos os vertebrados, é conduzido então o sangue que vem do baço e do intestino, ao fígado. As veias intestinais que correm para o fígado, formam o sistema de porta deste órgão. Nos peixes, o fígado tem também outra importante

função, estocar gordura (Figura 4), substância útil para a reprodução (Harder, 1975; Vargas & Ribeiro, 2009).

Anatomicamente, esta glândula apresenta características morfológicas típicas evidenciadas em diferentes espécies animais. Sua forma é extremamente variável, não só interespecificamente, mas também em diferentes indivíduos de uma mesma espécie. Roux (1922) citado por Harder (1975) afirmou que não há nenhuma forma específica pois, o tecido do fígado vem ocupar algum do espaço vazio entre a parede do corpo, o intestino, o baço, a bexiga e o pâncreas; pode ser dito que forma um arranjo no espaço que ocupa. Porém, é verdade que o fígado está prensado entre todos os outros órgãos na parte anterior da cavidade de corpo; sua forma então, especialmente em peixes, parece ser determinada pelo menos parcialmente pelos órgãos que o cercam.

Segundo Stoskpof (1993), histologicamente o fígado dos peixes é muito semelhante ao dos outros vertebrados. É uma glândula retículo-tubular recoberta por uma membrana serosa. Várias espécies de peixes possuem uma considerável quantidade de tecidos de ligação que vão formar a cápsula hepática (Stoskpof, 1993; Takashima & Hibiya, 1995). O parênquima celular é concentricamente arranjado ao redor dos sinusóides, o qual pode ser considerado o centro anatômico por onde passam os canais hepáticos sendo que alguns autores ainda reconhecem principalmente o canal biliar como o centro dos canais mesmo sem suas considerações funcionais (Takashima & Hibiya, 1995; Junqueira & Carneiro, 1999). Seu estroma é composto de fibras reticulares e colágenas que circunda as células e sinusóides. O teor de colágeno aumenta de 0,05% nos animais imaturos, para 0,7% nos animais maduros (Figura 4).

O principal tipo de célula no fígado são os hepatócitos, representando cerca de 80% das células deste órgão. Estas são parenquimatosas, poliédricas e grandes, com seis faces e se agrupam em placas orientadas radialmente anastomam-se entre si, formando unidades morfológicas chamadas lóbulos hepáticos (Junqueira & Carneiro, 1999), sendo o espaço que fica entre as placas de hepatócitos ocupado por capilares sinusóides. Assim, cada lóbulo é uma massa poliédrica de tecido hepático de mais ou menos 0,7 por 2 mm de tamanho. Em certos animais, como o porco, os lóbulos são separados entre si por uma nítida faixa de tecido conjuntivo. Em algumas regiões, entretanto, estes lóbulos são separados por vasos e tecido conjuntivo chamados de espaço porta, o qual apresenta no seu interior uma vênula e uma arteríola, que são ramos da *veia porta* e da *artéria hepática,* um ducto biliar e vasos linfáticos envoltos por uma bainha de tecido conjuntivo (Kessel, 2001; Gartner & Hiatt, 2003). No centro dos lóbulos, observa-se uma veia, denominada de veia centrolobular, onde desembocam os capilares sinusóides. Como o sangue percorre os sinusóides da periferia para o centro dos lóbulos, as mais periféricas recebem, primeiramente, tanto os nutrientes e oxigênio, como eventuais substâncias tóxicas trazidas pela veia porta e pela artéria hepática. Este fato explica as diferenças de comportamento entre as células perilobulares e centrolobulares, em condições normais ou patológicas.

Estas células podem ainda exibir dois tipos de possibilidades de superfície, sinusoide ou serosa. A superfície serosa é comum e mostra especializações imperceptíveis como pequenas microvilosidades e raras

vesículas pinocíticas. Em contraste, as porções da membrana adjacente das células endoteliais do sinusóide exibe numerosas microvilosidades que formam uma ampla zona intercelular, o espaço de Disse. Fibras de colágeno e outros tipos de celulas revestem a parede dos capilares encontrados no espaço de Disse, as células endoteliais típicas, armazenadora de gorduras; macrófagos que neste órgão são chamadas de células de Kupffer, as quais fazem parte do sistema mononuclear fagocitário; células mesoteliais (serosa) e fibroblastos complementam a arquitetura básica do fígado (Takashima & Hibiya, 1995).

Cada hepatócito apresenta um ou dois núcleos arredondados e centrais, com um ou mais nucléolos bem evidentes. A organela mais evidente é o retículo endoplasmático, na forma lisa ou rugosa. Na forma rugosa aparece como corpúsculos basófilos da microscopia clássica. É nessa organela que ocorre a síntese de várias proteínas plasmáticas produzidas pelo fígado, entre as quais a albumina e o fibrinogênio do sangue. Cada célula abriga muitos perfis de complexo de Golgi, principalmente nas vizinhanças dos canalículos biliares. Por causa da necessidade energética dos hepatócitos cada célula contém mais de 2.000 mitocôndrias (Kessel, 2001).

A bile, é o mais importante produto secretado pelos hepatócitos, é conduzida ao intestino e possui o papel de emulsificar a gordura, e está envolvida na digestão de proteínas causando a precipitação de certos componentes proteicos. A bile foi considerada por muito tempo um “produto-desperdício”, antes de que suas funções fossem de fato conhecidas (Harder, 1975; Gutierrez et al., 1988).

Em peixes, os hepatócitos têm ainda outras funções vitais diferentes da secreção de bile. Apresentam atividade enzimática e proporcionam resistência ao animal, em virtude da produção de glicogênio (Macha et al., 1983). Convertem proteínas em carboidratos ou gordura, com a liberação de resíduos nitrogenados que são levados às brânquias, para serem eliminados (Hildebrand, 1995). São envolvidos na hematopoiese e produção de anticorpo durante vida larval. Acima de tudo, eles também servem como locais de armazenamento para alguns nutrientes (Harder, 1975).

Outro componente importante do hepatócito é o glicogênio, que se apresenta como grânulos grosseiros. A quantidade de glicogênio presente nos hepatócitos é muito variável e funciona como depósito que a célula hepática mobiliza quando ocorre uma queda da glicose no sangue circulante.

O tamanho das células hepáticas em estudos microscópios reflete o estado funcional fisiológico do animal, e é notadamente diferente em estados de hiper e hipo função. Um exemplo bom do aparecimento variável da célula hepática é a hipertrofia de corpo da célula, núcleo e nucléolo, que ocorrem no período ativo de vitelogênese em fêmeas de *Oncorhynchus masou* e *Plecoglossus altivelis*, ou o encolhimento destes elementos durante privação alimentar prolongada (Takashima & Hibiya, 1995).

Pela sua grande atividade aliada à toxidez das substâncias, efeitos drásticos podem ser observados nos hepatócitos, tais como: migração dos núcleos para a periferia, atrofia ou hipertrofia celular, vacuolização intensa e focos de necrose (Fanta et al., 1991). Takashima & Hibiya (1995), destacam ainda variações nos elementos que envolvem os hepatócitos, tais como infiltração de gordura, congestão de sangue nos sinusóides e fibrose.

De acordo com Stoskpof (1993), o fígado de vários peixes ser levemente pigmentado. Isto se deve à presença de melanomacrófagos, os quais vem a ser indicativos de resposta inflamatória. Outras vezes ocorre o oposto, fígado claro e com aspecto esbranquiçado, especialmente em animais de cativeiro, os quais são alimentados com dietas artificiais, enquanto que em animais selvagens este sintoma é raro.

Diversos estudos têm demostrado a ocorrência de alterações histológicas de fígado, mais precisamente neoplasias hepáticas decorrentes da ingestão de alimentos contaminados por aflatoxinas (Bailey et al, 1984; Alexandrino, 1998; Arana et al., 1996). Em *O. niloticus* (Chavéz-Sánchez et al., 1992) e em *O. mykiss* (Arana, 1996), a primeira indicação de intoxicação química observadas foram alterações nucleares, bem como a presença de áreas constituídas de hepatócitos, com citoplasma intensamente vacuolizado. Porém, Hendricks et al. (1990) relataram que as primeiras indicações de estabelecimento de lesões são a ocorrência de focos de células basófilas e frequentes sinais de mitose.

Estudos histológicos em peixes expostos a hidrocarbonetos específicos mostraram que estas substâncias provocaram, em alta frequência, sinais de neoplasias no tecido hepático, indicando que os peixes podem ser suscetíveis a efeitos carcinogênicos desses agentes, nos níveis que podem ser encontrados no meio ambiente (Hart et al., 1998). Lesões histopatológicas, possivelmente causadas pela presença das substâncias tóxicas no fígado, com certa desestruturação do retículo endoplasmático e das mitocôndrias celulares têm sido relatadas (Ribeiro, 2007), bem como células inchadas e a presença de núcleos deformados e perda de nucléolos (Marty et al., 2003).

Peixes expostos ao BTX, por sete dias, apresentaram algumas áreas focais com necrose de hepatócitos, o que, após tempos mais prolongados poderia levar a carcinogênese hepática (Rodrigues & Fanta, 1998).

Assim como ocorre com análises histopatológicas de brânquias, esses estudos das alterações no fígado também têm sido ferramentas eficientes na identificação de efeitos subletais do óleo de peixes (Nero et al., 2006), bem como no biomonitoramento de áreas supostamente impactadas (Oliveira Ribeiro et al., 2005).

Um outro aspecto relevante para a utilizaçao desta técnica simples, é o diagnóstico da presença de organismos patogênicos e lesões causadas por estes no parênquima hepático (Figura 5). Como foi demonstrado por Cavichiolo et al. (2008) em tuviras parasitadas e por Campos et al. (2008) em *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* e *Pseudoplatystoma fasciatum* apresentando cistos de mixosporídeos. Além disso, Campos et al. (2008) relataram sinais de hepatodistrofia difusa em 50% das amostras de fígado destes peixes estudados, sendo que mais de 80% dos espécimes de *P. fasciatum* apresentaram ainda formações hialinas concêntricas e com esteatose (50%).
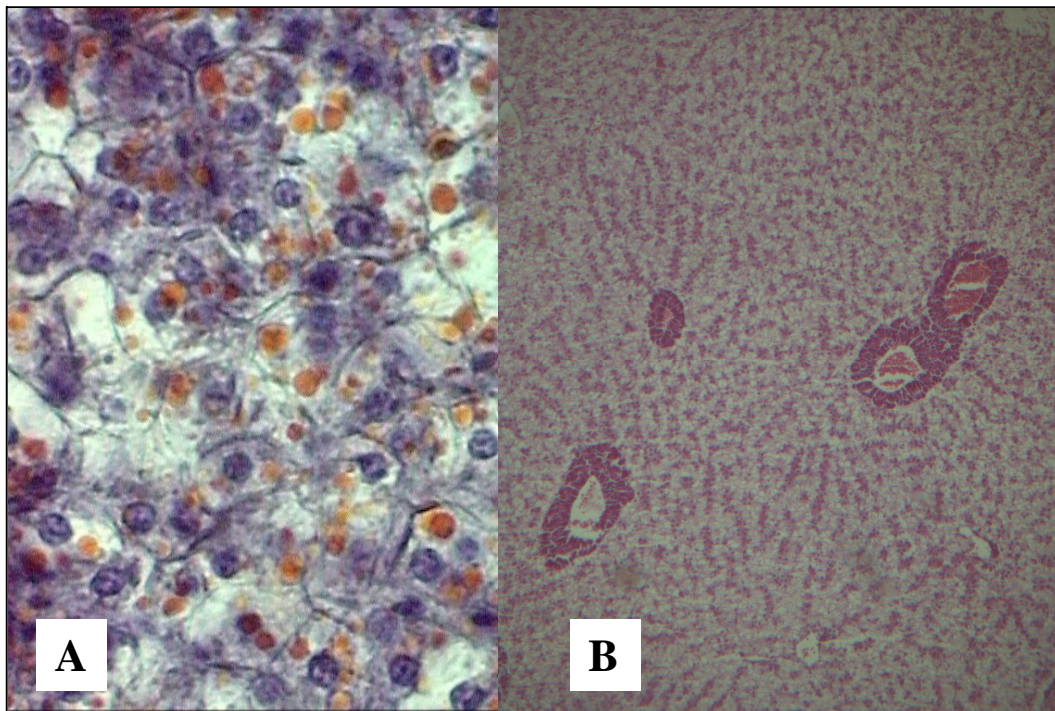
Figura 4. (**A**) Cortes histológicos de fígado de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* evidenciando inclusão lipídica em laranjado (40X, Sudan). (**B**) Parenquima Hepático normal (10X HE).
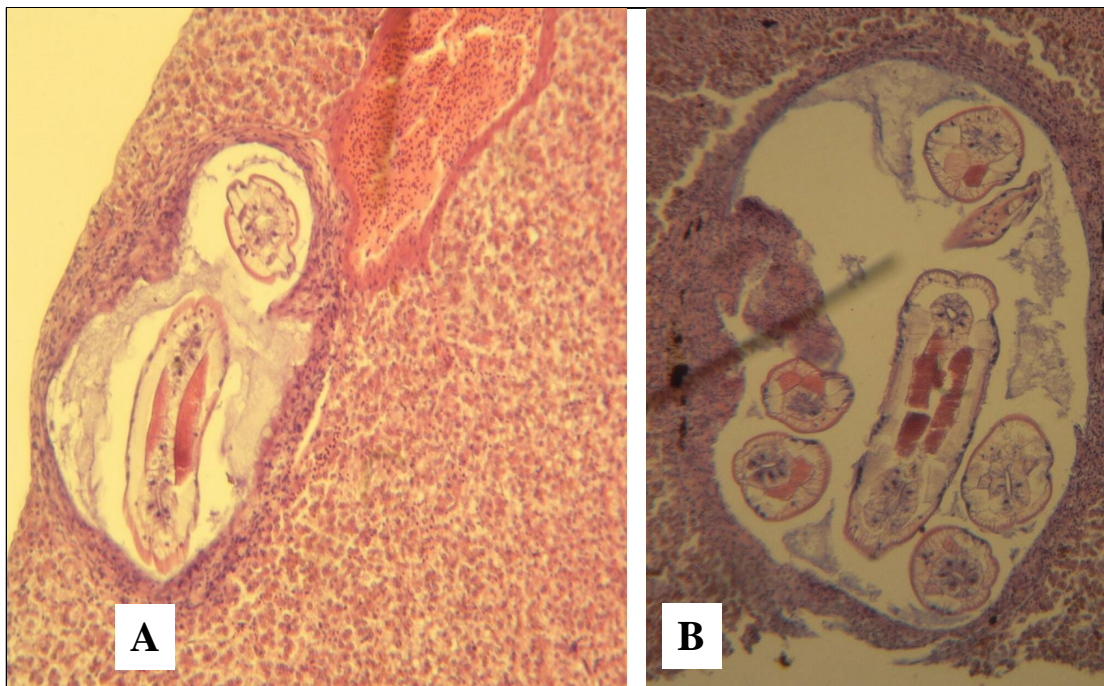
Figura 5. Cortes histológicos do fígado de tuvira *Gymnotus carapo* evidenciando a presença de parasitos. (**A-B**) Parênquima hepático apresentando cistos de nematóides (20X, HE).

Intestino

Diversos estudos vêm sendo direcionados no intuito de relacionar as características estruturais, anatômicas e/ou histológicas do tratato digestório dos peixes com seus hábitos e comportamentos alimentares (Menin, 1988; Logato, 1995; Gomide, 1996; Moraes et al., 1997). Estes estudos têm mostrado que, em geral, devido à enorme diversidade de espécies, há uma consequente diferenciação morfofisiológica do sistema digestório e, neste aspecto, a histologia tem sido uma grande aliada nos estudos referentes à nutrição de peixes. Pois estes animais apresentam hábitos e comportamentos alimentares diversos e a nutrição está intimamente ligada aos seus aspectos morfofisiológicos de sistema digestório.

O sistema digestório dos peixes é dividido em: intestino cefálico, que compreende a cavidade bucofaringeana; intestino anterior, que compreende o esôfago e o estômago; o intestino médio, que compreende o intestino propriamente dito; e intestino posterior, que é o último segmento do tubo nos peixes que não possuem valva ileorretal, ou reto, que é a denominação dada ao último segmento nos peixes que possuem valva ileorretal (Prejs, 1981).

O intestino é um tubo relativamente simples, iniciando na válvula pilórica e terminando no reto, não sendo separado em delgado e grosso, como nos mamíferos. Possui glândulas digestivas e um suprimento abundante de vasos sanguíneos e linfáticos, onde se completa a digestão iniciada no estômago. No intestino é onde ocorre a maior parte da absorção dos nutrientes, íons e água oriundos da dieta, sendo os produtos da digestão mantidos em solução, o que facilita a absorção. Uma característica básica do intestino dos teleósteos é a presença de pelo menos dois segmentos intestinais, mesmo sem a separação entre intestino delgado e grosso (Rotta, 2003).

Na primeira porção ocorre a absorção de nutrientes em suas formas menores (monossacarídeos, aminoácidos e ácidos graxos), enquanto a segunda parte é responsável pela entrada de macromoléculas por pinocitose (mecanismo de penetração de fluidos na célula através da invaginação da membrana celular, com a formação de vesículas internas). As porções intestinais que apresentam mucosa mais complexa estão envolvidas, de modo geral, nos processos absortivos (Figura 6A). Nos peixes, além da função de digestão e absorção, o intestino pode desempenhar outras funções, como auxiliar na osmorregulação ou na respiração (Rotta, 2003)

O comprimento do intestino varia conforme o hábito alimentar (Figura 6B) e as características dos alimentos naturalmente ingeridos pelos peixes. Os carnívoros possuem, basicamente, um intestino curto, reto e espesso, os onívoros um intestino em forma de “N” e os herbívoros possuem um intestino longo, enovelado e fino. O comprimento do intestino parece estar mais correlacionado com a quantidade de materiais indigeríveis do que com a natureza do alimento (vegetal ou animal). Peixes herbívoros e fitoplanctófagos consomem alimentos de menor digestibilidade e apresentam, geralmente, intestinos mais longos se comparados aos peixes carnívoros.

Segundo Seixas Filho et al. (2000) as características anatômicas do aparelho digestório dos peixes acham-se em estreita dependência com a natureza dos alimentos, as características do habitat, o estado nutricional e o

estádio de desenvolvimento do indivíduo, manifestados, especialmente nesse aparelho, por adaptações e modificações. Essas são variações morfológicas provocadas pela ação de fatores do ambiente sobre o organismo, podendo ser de caráter permanente, produzidas na evolução filogenética, como no caso das adaptações, ou de caráter temporário, produzidas no ciclo ontogenético do indivíduo, chamadas de modificações (Angelescu & Gneri, 1949).

Vários autores (Angelescu & Gneri, 1949; Al-Hussaini, 1946, 1947, 1949; Hidalgo & Alliot, 1987), ressaltaram a importância do conhecimento da morfologia do tubo digestivo dos peixes, uma vez que esta morfologia pode ser muito variável, denotando assim a diversidade de seus regimes alimentares e de seus modos de vida. Hidalgo & Alliot (1987) enfatizaram, por exemplo, o comprimento do tubo digestivo, que repercute de maneira importante nos aspectos quantitativos da digestão e absorção de alimento. Da mesma forma, se considera imprescindível, antes do aprofundamento no estudo dos distintos mecanismos de absorção intestinal, o conhecimento das características anátomo-histológicas do intestino dos peixes (Gallego & Rus, 1987).

Enquanto alguns autores procuram relacionar o arranjo intestinal com os hábitos alimentares, outros (Al-Hussaini, 1949; Bértin, 1958; Kapoor et al., 1975; Khanna, 1961; Sastry, 1973; Menin, 1988; Junger et al., 1989; Logato, 1995; Gomide, 1996; Moraes et al., 1997), afirmaram que o comprimento relativo do intestino dos peixes varia conforme o hábito alimentar, sendo que o intestino mais curto é encontrado freqüentemente nos peixes carnívoros e o mais longo, nos herbívoros e iliófagos.

Existem duas adaptações gerais conforme o hábito alimentar. Os herbívoros apresentam uma grande ingestão e rápido trânsito de alimento no intestino, distribuem a superfície absortiva em um longo intestino com mucosa pouco pregueada, permitindo que o alimento permaneça mais tempo em contato com as enzimas, de modo a aumentar a eficácia da digestão, compensando o baixo valor nutritivo do alimento ingerido. Os carnívoros apresentam um intestino curto, mas como a quantidade de alimento ingerido é menor e a qualidade é superior, o trânsito é mais lento, sendo este aspecto importante para favorecer a difusão dos nutrientes para dentro das numerosas e profundas pregas que existem na mucosa intestinal antes de serem absorvidos. As pregas da mucosa intestinal mais complexamente estruturadas estão relacionadas com o hábito alimentar carnívoro, estando envolvidas nos processos absortivos dado ao aumento da área superficial dessa estrutura. No caso dos peixes carnívoros com secos pilóricos, o trânsito alimentar é ainda mais lento, pois o alimento que entra nesses sacos de fundo cego deve retornar novamente a luz do intestino para então ser excretado (Rotta, 2003).

As pregas da mucosa intestinal também estão relacionadas com o transporte do material em processamento: pregas longitudinais auxiliam o transporte desse material, acelerando-o, ao passo que pregas transversais retardam o seu trânsito, uma vez que atuam como obstáculos à sua passagem.

Deve-se destacar que peixes onívoros e herbívoros apresentam a capacidade de alterar a estrutura e as propriedades absortivas do seu sistema digestivo em resposta às mudanças na dieta, sendo, portanto

substratos dependentes. O aumento na quantidade de glicídios na alimentação pode provocar aumento no comprimento do intestino e na absorção de glicose por alguns teleósteos, não ocorrendo este fato nos carnívoros, que possuem o intestino mais curtos, porém com um maior número de dobras, melhorando a eficiência de absorção dos nutrientes ingeridos, como o pintado e a truta arco-íris. Essas diferenças devem-se, provavelmente, à adaptação das espécies, pois peixes onívoros e herbívoros estão sujeitos a grandes variações na composição bromatológica da dieta, diferentemente do que ocorre na dieta dos carnívoros. Intestinos mais curtos apresentam maior número de dobras, melhorando a eficiência de absorção dos nutrientes ingeridos, como no caso das espécies carnívoras (Seixas Filho, 2000).

As relações entre o arranjo das pregas mucosas e a velocidade de transporte do alimento no intestino médio sugerem que o padrão longitudinal com numerosas anastomoses retardam o avanço do alimento em sentido aboral, o que possibilita maior período digestivo e, consequentemente, maior aproveitamento dos nutrientes, em virtude da exposição do material alimentar à mucosa intestinal por maior período, além de contribuir para a preparação do bolo fecal.

As pregas longitudinais dispostas auxiliam no direcionamento do conteúdo intestinal e na distensão das paredes intestinais, adaptando-as à acomodação do material que o intestino médio e o reto recebem. As pregas da mucosa próxima ao ânus têm direção longitudinal, podendo-se supor que elas devam auxiliar na expulsão dos bolos fecais, direcionando-os para o exterior.

No padrão da mucosa na porção cranial da segunda alça do intestino, as pregas são menos espessas e mais longas, com raras anastomoses. Na porção mediana, as pregas são ainda menos espessas e mais curtas que a porção anterior e apresentam maior sinuosidade nas bordas livres na sua porção caudal, dispostas, em relação à parede intestinal de forma mais oblíqua. Na terceira alça, as pregas apresentam a menor espessura em relação a todas as porções das alça anteriores e possuem acentuada sinuosidade de suas pregas paralelamente dispostas em relação à parede intestinal. Na porção cranial da quarta alça intestinal, as pregas apresentam a menor espessura, menor altura e grande sinuosidade em relação aos segmentos intestinais anteriores, podendo ser observada a presença da valva ileorretal limitando o intestino médio com o reto (Seixas Filho, 2000).

Outras estruturas que auxiliam na digestão são as dobras e cristas do epitélio mucoso no intestino médio que aparecem em grande quantidade e variedade e que servem para aumentar a superfície de secreção e absorção. Nos peixes privados de alimentos, essas estruturas diminuem muito, como também o diâmetro e o comprimento do intestino.

Nas espécies carnívoras, as pregas da mucosa encontram-se mais complexamente estruturadas (Khanna & Mehrota, 1971). Angelescu & Gneri (1949) relacionando a estrutura da mucosa intestinal com os processos fisiológicos da digestão e absorção, verificaram que a região com as pregas mais complexas estaria mais envolvida com os processos absortivos, dado o aumento da área efetiva para a absorção de nutrientes. Observações semelhantes foram feitas por Fugi & Hahn (1991), Logato (1995), Moraes & Barbola (1995) e Gomide (1996). Essas relações podem ser bem

evidenciadas no estudo feito por Seixas Filho et al. (2000) em surubins onde em duas diferentes fases de desenvolvimento os dois primeiros terços intestinais apresentaram-se com a mucosa extremamente desenvolvida, estando, provavelmente, mais relacionada com os processos de absorção dos nutrientes.

Estudos para estabelecer relações entre o arranjo das pregas na mucosa e a velocidade de transporte do alimento no intestino médio de surubins sugerem que um padrão longitudinal com numerosas anastomoses, retardando o avanço do alimento em sentido aboral, possibilitando um maior período digestivo e, consequentemente, maior aproveitamento dos nutrientes (Seixas Filho et al., 2000), corroborando os achados de Menin (1988), Logato (1995) e Gomide (1996). Pode-se ainda supor que, as pregas longitudinalmente dispostas auxiliam no direcionamento do conteúdo intestinal.

Em estudos realizados por Cavichiolo et al. (2004a, b) com rações contendo diferentes níveis e fontes de proteína verificaram que a morfologia do intestino sofre variações quanto à fonte e níveis de proteína na dieta, aumentando ou diminuindo a altura e parede de suas vilosidades.
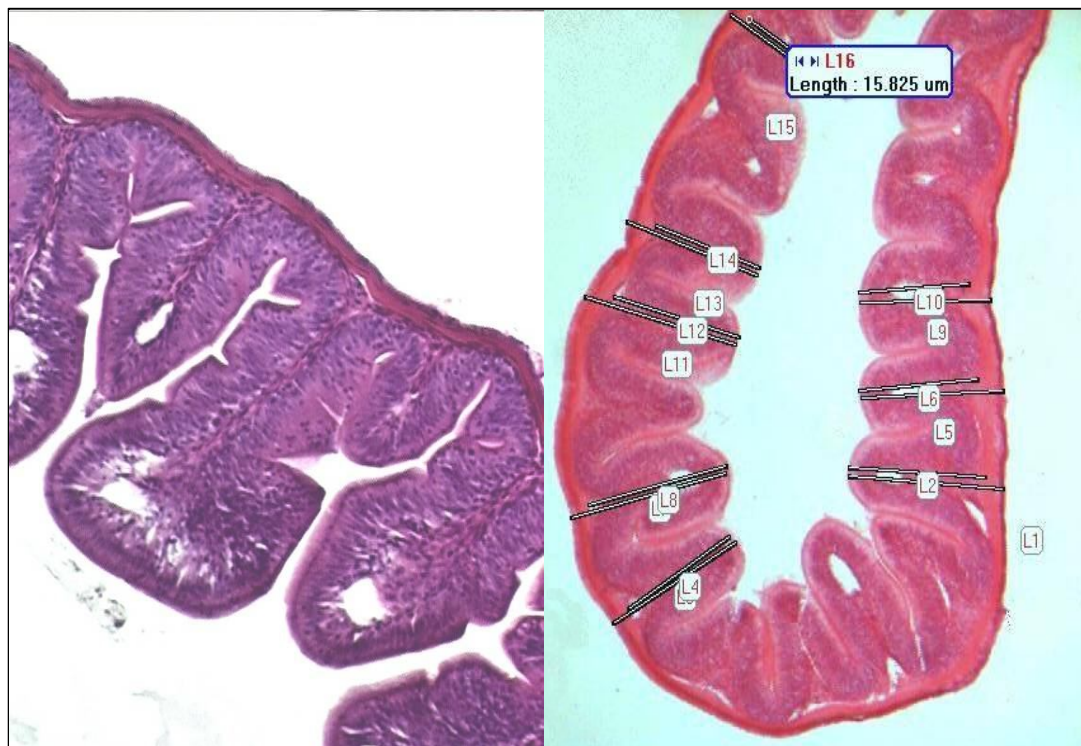
Figura 6. (**A**) Corte histológico de intestino (30X, HE) de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* e (**B**) exemplificando medidas de vilosidade e parede total (10X, HE).

Considerações finais

Com base nos relatos anteriores, pôde-se concluir que, além dos conhecimentos sobre a histologia dos órgãos dos peixes, é também fundamental o conhecimento da biologia de cada espécie. Devido à diversidade das dietas alimentares usadas na piscicultura e o modo de vida de cada peixe, a morfologia do tubo digestório dos peixes pode apresentar variação, assim se deve conhecer e relacionar esses fatores. Pois a correlação dos mesmos é que fornece subsídios para melhor compreensão do desempenho dos peixes nas piscigranjas.

Referências

AL-HUSSAINI, A. H. 1946. The anatomy and histology of the alimentary tract of the bottom-feeder *Mulloides auriflamma* (Forsk.). *J. Morphol.*, 78:121-154.

AL-HUSSAINI, A. H. 1947a. The anatomy and histology of the alimentary tract of the plankton feeder, *Atherina forskali* (Rupp.). *J. Morphol.*, 80: 251-286.

AL-HUSSIANI, A. H. 1949a. On the functional morphology of the alimentary tract of some fish in relation to differences in their feeding habits. I. Anatomy and histology. *Quart. J. Microsc. Sci.*, 90:109-139.

ALEXANDRINO, A. C. 1998. *Manual de prevenção de doenças em pisciculturas*. Boletin Técnico 23, Instituto de Pesca, Secretaria da Agricultura e Abastecimento de São Paulo.

ANGELESCU, V., GNERI, F. S. 1949. Adaptaciones del aparato digestivo al régimen alimenticio in algunos peces del rio Uruguay e del rio de la Plata. *Rev. Inst. Invest. Mus. Argent. Cienc. Nat.*, 1:161-272.

ARANA, S., BAZQUEZ, F. J. H, TABATA, Y. A. 1996. Verificação da eficácia de aluminiosilicato de sódio hidratado como absorvente da aflatoxina B1, em ração utilizada em cultivo de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), através de análises histopatológicas do fígado. In: IV EMBRAPOA, Pirassununga, 1996. Anais...p. 13.

ARELLANO, J. M.; BLASCO, J.; ORTIZ, J. B. 2000. Accumulation and histopathological effects of copper in gills and liver of Senegales Sole, *Solea senegalensis* and toad fish, *Halobatrachusdidactylus. Ecotoxicol. Environ. Restor*, 3: 22-28.

ARELLANO, J. M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. 1999. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 44: 62-72.

BAILEY, G. S.; HENDRICKS, J. D.; NIXON, J. E.; PAWLOWSKI, N. E. 1984. The sensitivity of rainbow trout and other fish to carcinogenesis. *Drug Metabolism Review*, 15: 725-750.

BÉRTIN, L. Appareil digestif. 1958. In: GRASSÉ, P.P. (Ed). *Traité de zoologie*. Paris: Masson, 13: 1249-1301.

CAMPOS, C. M.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. 2008. Histopatologia de fígado, rim e baço de *piaractus mesopotamicus*, *prochilodus lineatus,* p*seudoplatystoma fasciatum* parasitados por myxosporídios, capturados no

Rio Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet*., 17:4, 200-205,.

CAVICHIOLO, F., VARGAS, L. D., NATALI, M. R. M., MOREIRA, H. L. M., RIBEIRO, R. P., SILVA, L. C. R. 2000. Histologia de brânquias de alevinos de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidos a diferentes níveis de vitamina c (ácido ascórbico) na ração. *Braz. J. Morph. Sc*., 17: 88.

CAVICHIOLO, F. 2001. Emprego de vitamina C e vitamina E sobre a ocorrência de ectoparasitas e as alterações histológicas em brânquias de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) durante processo de reversão sexual. 31f. *Monografia do Curso de Especialização em Sanidade e Qualidade em Piscicultura da Universidade Estadual de Maringá*, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

CAVICHIOLO, F.; NATALI, M. R. M.; RIBEIRO, R. P.; CIOLA, A. L.; VARGAS, L.; MAEHANA, K.; CANCINO, M. E. C. 2004a. Morfometria de parede total e túnica mucosa do segmento proximal do intestino de tilápia do Nilo *(Oreochromis niloticus)* submetidas a diferentes níveis de proteína animal na ração em fase adulta. In: VIII JOVET - JORNADA DE MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIPAR, 2004, Umuarama. *Arq. Ciên. Vet. Zool. Unipar*, 7: 132-132.

CAVICHIOLO, F.; NATALI, M. R. M.; RIBEIRO, R. P.; CIOLA, A. L.; VARGAS, L.; MAEHANA, K.; CANCINO, M. E. C. 2004b. Morfologia do segmento proximal de intestino de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com diferentes níveis de proteína vegetal em fase adulta . In: In: VIII JOVET- Jornada de Medicina Veterinária da UNIPAR, 2004, Umuarama. *Arq. Ciên. Vet. Zool. Unipar*, 7: 131-131.

CAVICHIOLO, F.; PINTO, A. A.; FLORES, K.; RUSSO, M. R. 2007. Histologia de brânquias de peixes como ferramenta de indicativo de saúde. In: 34ºConbravet - CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, 2007, Santos-SP. Histologia de brânquias de peixes como ferramenta de indicativo de saúde, p. 34.

CAVICHIOLO, F; ISHIKAWA, M. M., RESENDE, E. K., FLORES DE SOUZA, K, PEREIRA, R. A. C. 2008. Alterações severas em brânquias de Tuviras (*Gymnotus carapo*). In: AQUACIÊNCIA 2008, Maringá, Paraná. *Anais*...

CAVICHIOLO, F., SOUZA, K. F.; CASTILHO, L. O. 2008. Histopatologia de fígado de tuviras (*Gymnotus carapo*) na região de Mato Grosso do Sul In: Anais do X ENBRAPOA - ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, Búzios, RJ.

CHAVEZ DE MARTINEZ, M. C. 1991. Histopatology of vitamin C deficiency in ciclhid, *Cichlasoma urophtalmus* (Gunther). *J. Fish Dis.*, 4: 17-519.

CHAVEZ-SÁNCHES, M. C.; MARTÍNEZ, P. C. A.; MORENO, I. O. 1994. Pathological effects of feeding Young *Oreochromis niloticus* diets supplemented with different levels of aflatoxin B1, *Aquaculture,* 127: 49-60.

DABROWSKI, K.; EL-FIKY, N.; KOCK, G.; FRIGG, M.; WIESER, W. 1990. equeriment and utilization of ascorbic acid and ascorbic sulfate in juvenile rainbow trout. *Aquaculture,* 91:317-337.

DANG, Z.; LOCK, R.; FLIK, G. 1999. Metallothionein response in gills of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper in fresh water. *Am. J. Physiol.*, 277: 320-331.

ERKMEN, B.; KOLANKAYA, D. 2000. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 64:418-425.

EVANS, D. H. 1987. The Fish Gill: Site of action and ,odel for toxic effects of environmental pollutants. *Environ. Health Perspec.*, 71:47-58.

EVANS, D. H; PIERMARINI, P. M; CHOE, K. P. 2005. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiol. Rev.*, 85: 97–177.

FANTA, E.; FANTA, E.S.; FEOFILOFF, E.F. 1991. Ação de poluentes sobre tecidos In: *Histologia de peixes*. FCAV-UNESP, Jaboticabal, p. 32-37.

FUGI, R., HAHN, N.S. 1991. Espectro alimentar e relações morfológicas com o aparelho digestivo de três espécies de peixes comedores de fundo do rio Paraná, Brasil. *Rev. Bras. Biol.*, 51:873-879.

GALLEGO, M. G., RUS, A. S. 1987. Absórcion intestinal en peces. In: ESPINOSA DE LOS MONTEROS, J., LABARTA, U. (Eds.). *Nutricion en acuicultura*. *Plan de formación de técnicos superiores en acuicultura I.* Madrid, p.123-171.

GARCIA-SANTOS, S.; FONTAÍNHAS FERNANDES, A.; WILSON, J. M. 2006. Cadmium tolerance in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following acute exposure: Assessment of some ionoregulatory parameters. *Environ. Toxicol.*, 21:33-46,.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. 2003. *Tratado de histologia em cores*. 2ª edição, Guanabara Koogam: Rio de Janeiro, 456p.

GOMIDE, A.T.M. *Anatomia funcional, e morfometria comparativas do tubo digestivo de trairão (Hoplias cf. lacerdae RIBEIRO, 1908) (Characiformes, Erythrinidae), em diferentes classes de tamanho*. Viçosa, MG: UFV. 1996. 76p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1996

GUTIERREZ, M. SARASQUETE, M. C., GONZALES CANALE, M. L. 1988. Histoquímica de enzimas en el higado de la anguila, Anguilla anguilla L., 1758 (Osteichthyes, Anguilidae) de las salinas de Cadiz. *Bol. Fisiol. Anim. Univer. São Paulo*, 12: 47-55.

HALVER, J. E.; SMITH, R. R.; TOLBERT, B. M.; BAKER, E. M. 1975. Utilization of ascorbic acid in fish. *Ann. New York Acad. Sc.*, 258: 81-102.

HALVER, J. E. 1979. Exigências dos peixes em vitaminas e minerais. In: CASTAGNOLLI, N. *Fundamentos da nutrição de peixes*. Piracicaba: Livroceres, 60pp.

HARDER, W. 1975. Anathomy of fishes. E. *Schweizerbart'sche Verlaggsbuch-handlung,* Stuttgart, Germany.

HART, L. J.; SMITH, S. A.; SMITH, B. J.; ROBERTSON, J.; BESTEMAN, E. G.; HOLLADAY, D. 1998. Subacute immunotoxic effects of the polycyclic aromatic hydrocarbon 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) on spleen and pronephros leukocytic cell counts and phagocytic cell activity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquat. Toxicol.*, 41:17–29.

HIDALGO, F., ALLIOT, E. 1987. La digestión en los peces. In: ESPINOSA DE LOS MONTEROS, J.; LABARTA, U. (Eds.). *Nutrición en* acuicultura I. Madrid: Plan de Formación de Técnicos Superiores en Acuicultura, p. 85-107.

HENDRIKS, H. G. C. J. M.; VAN DER INGH, T. S. G. A. M.; KROGDAHL, A.; OLLI, J.; KONINKX, J. F. J. G. Binding of soybean agglutinim to small intestinal brush border membranes and bush border membrane enzyme activities in Atlanticsalmon (Salmo solar). *Aquaculture*, n. 91, p. 163-170, 1990.

HILDEBRAND, M. 1995. *Análise de ultraestrutura dos vertebrados*. 3. ed., São Paulo: Atheneu, 700p.

JUNGER, H.; KOTRSCHAL, K.; GOLDSCHMID, A. 1989. Comparative morphology and ecomorphology of the gut in European cyprinids (Teleostei). *J. Fish. Biol.*, 34: 315-326.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNERO, J. *Histologia Básica*, 9º edição, Editora Guanabara Koogan, Rio de janeiro, RJ, 1999.

KAPOOR, B.G., SMIT, H., VERGHINA, I.A. The alimentary canal and digestion in fish. *Adv. Marine Biol.*, 13:109-239, 1975.

KARLSSON-NORRGREN, L.; RUNN, P.; HAUX, C. 1985. Cadmium-induced changes in gill morphology of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Uchanan) and rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 27: 81-95.

KESSEL, R. G. 2001. Histologia médica básica: *a biologia das células, tecidos e órgãos*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 386- 398.

KHANNA, S.S. 1961. Alimentary canal in some teleosts fishes. *J. Zool. Soc. India*, 13:206-219.

KHANNA, S. S., MEHROTRA, B. K. Morphology and histology of the teleostean intestine. *Anat. Anz. Bd.*, n.129, p.1-18, 1971.

LEONARDO, J. M. L. O. 1999. *Efeito de suplementação com diferentes níveis de vitamina C (ácido ascórbico) em larvas de tilápia do nilo (Oreochromis niloticus) de origem tailandesa durante a fase de reversão*. 39 p. (Dissertação de Mestrado em Produção Animal). Centro de Ciências Agrárias), Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

LEONARDO, J. M. L. O; VARGAS, L; RIBEIRO, R. P., CAVICHIOLO, F.; NATALI, M. R. M.; VOLSKI, T.; SILVA, L. 2000. Histologia de brânquias de tilápia do nilo *Oreochromis niloticus* de origem Tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C (ácido ascórbico). *Anais do VI Encontro Brasileiro Patologia de Organismos Aquáticos e II Encontro Latino Americano de Patologia de Organismos Aquáticos,* Florianópolis, SC, p. 174.

LIM, C.; LOVEL, R. T. 1978. Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictaulurus punctatus*). *J. Nutrition*, 108: 1137-1146.

LOGATO, P. V. R. 1995. *Anátomo-histologia funcional do aparelho digestivo do pacu, Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887 (Characiformes, Characidae, Myelinae)*. 1995. 118p. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

LOGATO, P. V. R. 1995. *Anátomo-histologia funcional do aparelho digestivo do pacu, Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887 (Characiformes, Characidae, Myelinae).*118p. Dissertação (Doutorado em Zootecnia). *Univiversidade* Fedederal de.

MACHA, N., FERRI, S. GEORGE, L. L. 1983. Sisgnilisation cythochemique des hepatocytes de teleosteens d'eau douce. *Bol. Fisiol. Animal Univ. São Paulo,* 7: 17-22.

MALLATT, J. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.*, 42:630-648.

MARTINS, M. L. 1994. Efeitos da suplementação de ácido ascórbico (vitamina C) avaliados através do desempenho e de aspectos anátomo-patológicos em alevinos de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). 76 p. (Dissertação de Mestrado em Aqüicultura - Centro de Aqüicultura da UNESP). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo.

MARTY, G. D.; HOFFMANNN, A.; OJIHIRO, M. S.; HEPLER, K.; HANES, D. 2003. Retrospective analysis: bile hydrocarbons and histopathology of demersal rockfish in Prince William Sound, Alaska, after the Exxon valdez oil spill. *Mar. Environ. Res.*, 56:569–584.

MAZON, A. F.; CERQUEIRA, C. C.; FERNANDES, M. N. 2002. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environ. Res.,* 88:52-63.

MCDONALD, D. G.; WOOD, C. M. 1993. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: *Fish ecophysiology*. London: Chapman & Hall, p.297-321.

MENIN, E. 1988. *Anátomo-histologia funcional comparativa do aparelho digestivo de seis Teleostei (Pisces) de água doce*. 557p. (Tese de Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. 2009. Nutracêuticos na nflamação e cicatrização e peixes de interesse zootécnico. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá, p. 625-723.

MORAES, M. F. P. G.; BARBOLA, I. F. 1995. Hábito alimentar e morfologia do tubo digestivo de *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) da Lagoa Dourada, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. *Acta Biol. Paranaense*, 24:1-23.

MORAES, M. F. P. G.; BARBOLA, I. F.; GUEDES, E. A. C. 1997. Alimentação e relações morfológicas com o aparelho digestivo do "curimbatá", *Prochilodus lineatus* (Valenciennes) (Osteichthyes, Prochilodontidae), de uma lagoa do sul do Brasil. *R. Bras. Zool.*, 14:169-180.

MONTEIRO, S. M. *Caracterização ultraestrutural do epitélio da brânquia de O. niloticus*: *Efeitos da exposição ao cobre*. 2001. 162p. (Dissertação de Mestrado) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.

MONTEIRO, S.M.; FONTAINHASFERNANDES, A.; SOUSA, M. Caracterização morfológica e ultrastrutural do epitélio branquial de peixes teleósteos. *Rev. Port. Zootec.*, v.XI, p.13-36, 2004.

MONTEIRO, S.M.; MANCERA, J.M.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. 2005. Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Bioch. Physiol.*, 141: 375-383.

MORAES, M. F. P. G. BARBOLA, I. F. 1997. Alimentação e relações morfológicas com o aparelho digestivo do curimbatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes) (Osteichthyes, Prochilodontidae), de uma lagoa do sul do Brasil. *Rev. Bras. Zool*., 14:169-180.

MERCHIE, G.; LAVENS, P.; SORGELOOS, P. 1997. Optimization of dietary vitamin C in fish and crustacean larval: a review. *Aquaculture*, 142:165-181.

MORGAN, M.; TOVELL, P. W. A. 1973. The structure of the gill of the trout *Salmo gairdneri* (Richardson). *Zool. Zellforsh*, 142: 147-162.

NERO, V.; FARWELL, A.; LISTER, A.; VAN DER KRAAK, G.; MEER, T. V.; MACKINNON, M. D.; DIXON, D. G. 2006. Gill and liver histopathological

changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 63:365–377.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. 2005. Bioaccumulation and the Effects of Organochlorine Pesticides, PAHs and Heavy Metals in Ells (Anguilla anguilla) from the Camargue Biosphere Reserve. *Aquat.Toxicol*., 74: 56–69.

PRATAP, H. B.; WENDELAAR BONGA, S. E. 1993. Effect of ambient and dietary cadmium on pavement cells, chloride cells, and sodium, potassium-ATPase activity in the gills of the freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* at normal and high calcium levels in the ambient water. *Aquatic Toxicol.*, 26:133-150.

PREJS, A. 1981. *Metodos para el estudio de los alimentos y las relaciones troficas de los peces*. Universidad Central de Venezuela y Universidad de Varsovia, Caracas, Venezula, 129pp.

PROCÓPIO, M. S.; RIBEIRO, H. J.; MORO, L; SATO, Y.; RIZZO, E.; CORRÊA JÚNIOR, J. D. 2008. Caracterização morfológica e histoquímica de brânquia do teleósteo curimatã-pacu, *Prochilodus argenteus* (Pisces, Prochilodontidae) da região da represa de Três Marias, rio São Francisco, Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35, 2008, Gramado, RS.

PHROMKUNTHONG, W.; BOONYARATPALIN, M.; STORCH, V. 1997. Different concentrations of ascorbyl-2-monophosfphate-magnesium as a dietary sources of vitamin C for seabass, *Lates calcifer*. *Aquaculture*, 151: 225-243.

RIBEIRO, A. E. 2007. *Efeitos de concentrações subletais dos hidrocarbonetos poliaromáticos específicos BTX (benzeno, tolueno e xileno) no peixe Sphoeroides testudineus (Linnaeus, 1758) através de biomarcadores bioquímicos e histológicos*. 61p. (Tese de doutorado). Universidade Federal Paraná, Curitiba, Paraná.

RODRIGUES, E. L.; FANTA, E. 1998. Liver histopathology of the fish Branchydanio rerio Hamilton-Buchman after exposure to sublethal levels of the organophosphate dimethoate 500. *Rev. Bras. Zool.*, 15: 441–450.

ROTTA, M. A. 2003. *Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura*. Documento 53; Corumbá, Embrapa Pantanal, 48 p.

SASTRY, K. V. 1973. Comparative morphology and histology of the alimentary canal in two teleost fishes. *Folia Morphol.*, 21:31-39.

SEIXAS FILHO, J. T.; BRÁS, J.M.; GOMIDE, A. T. M.; OLIVEIRA, M. G. A.; DONZELE, J. L.; MENIN, E. 2000. Anatomia funcional e morfometria dos Intestinos e dos cecos pilóricos do Teleostei (Pisces) de água doce *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849). Rev. Bras. Zootec., 29:313-324.

SOLIMAN, A. K., JAUNCEY, K., ROBERTS, R. S. 1994. Water soluble vitamin requirements of tilapia: Ascorbic acid (vitamin C) requirements of Nile tilapia, *O. niloticus* (L.). *Aquacul. Fish. Manag.*, 25:269-178.

STOSKOPF, M. K. 1993. *Fish Medicine*. 9ª ed. W. b. Saunders Company, United States of America, 882 p.

TAKASHIMA, F., HIBIYA, T. 1995. (Ed). *An atlas of fish histology. Normal and pathological features.* 2nd Ed. Tokio: Kodanska; Stuttgard, New York: Gustav Fisher Verlag, p. 68-71.

THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E. S. 2003. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ. Pollut.*, 121:307-320.

VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P. 2009. Homeopatia populacional em tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus*. In: TAVARES-DIAS, M. (Org). Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá: Embrapa Amapá, p. 106-131.

WONG, C. K.; WONG, M. H. 2000Morphological and biochemical changes in the gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. *Aquatic Toxicol.,* 48:517-527.

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo
Tavares-Dias, M. (Organizador)

Capítulo 24

Nutracêuticos na inflamação e cicatrização de peixes de interesse zootécnico

Flávio Ruas de Moraes & Julieta Rodini Engracia de Moraes

Resumo
Neste capítulo inicialmente estão apresentados conceitos básicos sobre inflamação e cicatrização e alguns modelos experimentais para indução e avaliação desses processos. A seguir discutem-se brevemente os resultados de trabalhos sobre efeitos de alguns nutrientes nos fenômenos inflamatório e cicatricial em peixes de exploração zootécnica.

Abstract
This chapter describes basic concepts on inflammation and wound healing reactions, and experimental models for induction and evaluation of these processes. Soon afterwards, were presented and also shortly discussed the results some studies on effects of nutrients on the inflammatory and dermal wound healing processes that were made in cultured fish.

Introdução

O sistema de criação intensiva praticado pelas pisciculturas industriais caracteriza-se por elevada densidade de estocagem e nível de arraçoamento (Shoemaker et al., 2000). Em decorrência, aumentam as situações que prejudicam o equilíbrio do sistema ambiente-parasito-hospedeiro, causadas pela má qualidade ambiental, deficiências nutricionais e enfermidades infecciosas e parasitárias.

A água, o muco da superfície corporal e, particularmente, o trato digestivo dos peixes são reservatórios naturais de variada flora bacteriana e fauna parasitária. Diversos agentes biológicos que convivem com os peixes no sistema aquático são responsáveis por várias doenças de caráter oportunista. Alta densidade populacional, excesso de matéria orgânica e outras condições que produzam aumento no teor de amônia, quando em

temperatura e pH apropriados, favorecem a proliferação de agentes com potencial patogênico no sistema aquático. Por outro lado, a má qualidade do ambiente, associado ao manejo usual de pisciculturas, são situações capazes de induzir o estresse e causar imunossupressão nos peixes. Esses fatores somados produzem o aumento da tensão ambiental de infecção levando aos surtos de enfermidades comuns na piscicultura.

Os organismos estressados tornam-se mais susceptíveis às infecções diversas e tal susceptibilidade relaciona-se com os altos níveis circulantes de cortisol (Mazeaud & Mazeaud, 1981; Mazeaud et al., 1977; Wedemeyer, 1970, 1997; Robertson et al., 1987; Barton et al., 1980; Barton & Iwama, 1991; Woo & Bruno, 1998; Montero et al., 1999).

O aumento dos níveis plasmáticos de cortisol ocorre em alguns minutos após procedimentos comuns em piscicultura e volta à condição basal em três a seis horas (Davis & Parker, 1986; Robertson et al., 1987, 1988; Barry et al., 1993) ou mais (Noga et al., 1994). Quando a situação adversa se prolonga ocorre o estresse crônico, em que os teores de cortisol plasmático permanecem altos por períodos maiores. Essa situação ocorre, por exemplo, quando há alta densidade de estocagem, que causa prejuízos para a reprodução e crescimento e imunossupressão dos peixes (Tort et al., 1996a, b; Rotlland et al., 1997; Montero et al., 1999; Fujimoto et al., 2005).

Neste último caso supramencionado, a resposta inflamatória está inibida facilitando a invasão, fixação, multiplicação e disseminação de agentes infecciosos e parasitários com a instalação de doenças. Quanto mais eficazmente for realizada cada uma destas ações, mais virulento será o patógeno. O poder patogênico e, por conseqüência, o desenvolvimento de doenças infecciosas depende da virulência do agente e da resistência do organismo infectado. Nesse caso, a virulência representa o conjunto de recursos que o agente infeccioso dispõe para desenvolver a infecção, enquanto a resistência é representada pelos vários mecanismos de que dispõe o hospedeiro para impedir que a infecção ocorra, tais como: as barreiras naturais, respostas inflamatória e imune, anticorpos e outros. Essas duas variáveis embora sejam propriedades intrínsecas do agente patogênico e do hospedeiro, não devem ser vistas como independentes, pois quanto maior a resistência do segundo, menos eficaz a virulência do primeiro. Quando a virulência e a resistência do hospedeiro variam independentemente, o efeito resultante será a patogenicidade, que será proporcional à variação dessas duas forças.

Quando a resistência do hospedeiro for mantida constante, a virulência do agente patogênico pode ser incrementada por meio de inoculações ou “passagens” sucessivas “in vivo”. Bactérias inicialmente de baixa virulência podem ter essa capacidade extremamente aumentada. O aumento de virulência ocorre mesmo quando as passagens são realizadas em organismos resistentes. O inverso ocorre com as subculturas repetidas em meios artificiais. A virulência pode ser atenuada por exposição a condições desfavoráveis como temperatura imprópria, envelhecimento das culturas, ou pela adição de íons que modifiquem o código genético do agente, provocando mutações. Essas situações são comuns em bacteriotecas quando se pretende manter estoques para estudos experimentais. Assim, a observação atenta dessas questões é fundamental para o sucesso de modelos experimentais de estudos de patologia em animais de laboratório, quando os processos

inflamatório e cicatricial e outros mecanismos de defesa são considerados, e quando se usa técnicas de indução de enfermidades infecciosas e parasitárias.

A luta pela existência entre diferentes espécies biológicas é determinada pelo convívio íntimo e vizinho em que se encontram, e a necessidade que têm de aproveitar os mesmos elementos do ambiente para seu metabolismo. Estes dois fatores são em parte responsáveis pelo fato de que a vida se desenvolva em ambiente de competição constante e que espécies que tenham mecanismos adequados tenham sobrevivido e as menos dotadas tenham desaparecido ou tendem a desaparecer. Este conceito de sobrevivência do melhor dotado reflete o drama contínuo da natureza em que as diferentes espécies procuram ganhar para si os elementos necessários para seu crescimento e reprodução, seja do ambiente ou de outros organismos. Desse contato contínuo surgem diferentes tipos de relações como o comensalismo, a simbiose e o parasitismo, e esta última é a que mais interessa do ponto de vista da patologia (Correa et al., 1975).

Do ponto de vista biológico, o parasitismo é uma relação normal entre dois ou mais seres vivos. A idéia de que o parasitismo é invariavelmente patológico deriva da preocupação do homem em preservar seu espaço na natureza. De fato, somente se fala de parasitismo no homem quando o membro não humano da relação produz alterações fisiopatológicas no homem ou no animal de seu interesse. Porém, em outros casos muito mais numerosos em que o homem parasita outros homens, animais ou a natureza, ainda que de alto interesse, não desperta a mesma atenção. A tendência de esquecer que o parasitismo é um fenômeno biológico natural conduz à ideia de que a relação seja beligerante. Por exemplo, os processos metabólicos ou de outra índole, que, acidentalmente, dificultam ou impedem o estabelecimento de diferentes parasitos no homem ou nos animais de seu interesse, são conhecidos como mecanismos de defesa. Por outro lado, aqueles que facilitam a entrada, fixação e multiplicação de parasitos são denominados mecanismos de agressão. Se os parasitos fossem mentores da medicina então essas denominações provavelmente fossem invertidas (Correa et al., 1975).

Importante destacar que os termos supracitados não devem mascarar a verdadeira natureza desses processos. Essas funções não foram desenvolvidas com o objetivo de impedir a entrada e desenvolvimento de parasitos no organismo do homem e outros animais, ou para favorecê-la, mas constituem um efeito colateral de processos fisiológicos em que a evolução biológica permitiu a sobrevivência do melhor dotado. Não se deve esquecer, porém, que esses processos podem ter dois lados, pois basta lembrar que os anticorpos, ao mesmo tempo que “combatem” agentes patogênicos, também são a razão de diferentes doenças de caráter autoagressão, como as alergias, síndromes reumáticas, nefróticas e tantas outras (Correa et al., 1975).

A inflamação

A inflamação aguda é caracterizada por fenômenos exsudativos, ou seja, de produção por fluídos e células que tentam eliminar, isolar ou circunscrever o agente agressor. Quando o agente causal é eliminado, o

processo evolui para a cura e o tecido perdido é repopulado por células semelhantes, fenômeno denominado regeneração ou reparação, quando células de origem conectiva ocupam morfologicamente o lugar das células lesadas. A evolução para um ou outro tipo depende do grau de especialização do tecido envolvido e da massa tecidual danificada. Nos processos gerais, ambos são observados, com exceção daqueles que ocorrem em tecidos que não sofrem mitoses na proporção necessária, ocorrendo apenas a reparação, como no músculo cardíaco ou no corpo de neurônios (Cotran et al., 2004).

A inflamação é a resposta dos tecidos vascularizados à agressão por agentes físicos, químicos e/ou biológicos. A imunidade inata ou não específica é a inflamação dirigida contra agentes antigênicos. A imunidade específica é representada por reações mediadas pela produção de imunoglobulinas (Ig), sendo a molécula tetramérica similar à IgM de mamíferos e necessita de sensibilização prévia (Scapigliati et al., 1999). Nos peixes, alguns relatos demonstram a existência de mais três imunoglobulinas, sendo elas, a IgD (Hirono et al., 2003), IgZ (Danilova et al., 2005) e a IgT (Hansen et al., 2005). A IgM existe sob duas formas alternadas, uma como receptor de membrana para antígenos de superfície de células B e outra como proteína solúvel, secretada como componente de fluídos corporais (Litman et al., 1999).

O acúmulo de leucócitos no sítio lesado é um dos principais eventos do processo inflamatório. A mobilização adequada e em tempo hábil de leucócitos da microcirculação para o foco inflamado é uma das etapas fundamentais da reação e se traduz na primeira ação de defesa do organismo e na principal característica do fenômeno. A fase aguda é caracterizada por vasodilatação arteriolar, capilar e venular, aumento de permeabilidade vascular acompanhada de formação de edema; aumento da viscosidade sangüínea e marginação leucocitária; diapedese, quimiotaxia; acúmulo de leucócitos, particularmente neutrófilos, no foco lesado e fagocitose por células competentes. Nessa fase, o fenômeno é de caráter exsudativo.

Quando o agente agressor persiste nos tecidos, a reação se cronifica e passa a apresentar caráter proliferativo, com o acúmulo de leucócitos mononucleares, tais como: macrófagos e seus derivados epitelióides e policariontes, linfócitos, plasmócitos, fibroblastos, fibras colágenas, angiogênese e, na dependência do agente causal, os eosinófilos. Este quadro pode sofrer pequenas variações em função do tipo de tecido afetado, do tipo e intensidade da agressão e do nível de especificidade da resposta. Todavia, o fenômeno é estereotipado e altamente complexo em função dos seus mecanismos de regulação envolvendo mediadores químicos autacóides e moduladores diversos de ação autócrina, parácrina e endócrina. O fenômeno tem como finalidade diluir, destruir ou circunscrever e isolar o agente lesivo, protegendo o organismo contra agressões (Garcia-Leme, 1989; Harkness, 1981).

A inflamação é uma resposta protetora básica do organismo e seu ponto de início determina, em última instância, os limites entre a total resistência à infecção ou a instalação da injúria (Pradhan et al., 2008). Esta, apesar de estereotipada, é altamente complexa em função de seus mecanismos de controle que envolvem substâncias farmacologicamente ativas, como eicosanóides derivados do ácido araquidônico, citocinas autacóides com efeito autócrino, parácrino e endócrino, além de hormônios

importantes como a insulina e os corticosteróides endógenos (Garcia-Leme, 1989).

Eventos vasculares da inflamação aguda

Nos peixes, os fenômenos vasculares são similares aos verificados em mamíferos. O fenômeno envolve a microcirculação, isto é, arteríolas pré-capilares, capilares e vênulas pós-capilares, considerando-se sua variação nos diferentes tecidos. Para efeitos de estudos experimentais considera-se a microcirculação do tecido conectivo subcutâneo e outros, em que os capilares sejam do tipo contínuo, isto é, que não tenham soluções de continuidade entre as células endoteliais e na membrana basal.

Após o estímulo lesivo ocorre vasodilatação arteriolar, capilar e venular, mediada por substâncias endógenas liberadas, pré-formadas ou ativadas localmente na zona injuriada. A vasodilatação arteriolar aumenta o aporte sanguíneo local. Os esfíncteres pré-capilares que, em condições normais se abrem e se fecham ritmicamente, sob os efeitos de agentes vasodilatadores, interrompem essa atividade e abrem-se todos ao mesmo tempo, permitindo que o sangue possa fluir por todo o leito capilar. Do mesmo modo, as vênulas pós-capilares sofrem aumento do calibre para receber o fluxo sanguíneo aumentado. A vasodilatação também é dependente da ativação da cascata do ácido araquidônico e da síntese local de prostaglandinas, em particular as prostaglandinas (PG) PGE_2 e PGI_2. A PGE_2 induz vasodilatação e sensibiliza as células endoteliais aos efeitos de potentes fatores de permeabilidade como a histamina e a serotonina. Em outras palavras, as prostaglandinas são as principais substâncias a induzir vasodilatação e ainda exercem efeitos regulatórios sobre o aumento de permeabilidade vascular desencadeado por outros mediadores. Seguindo-se à vasodilatação ocorre aumento de permeabilidade vascular em vênulas de médio calibre, que em condições normais são impermeáveis a macromoléculas. As proteínas plasmáticas, em especial a albumina, escapam dos vasos para o tecido intersticial, promovendo aumento da pressão osmótica tecidual e redução da pressão osmótica plasmática, que se somam ao aumento da pressão hidrostática dos vasos que estão com seu calibre aumentado. Todas essas forças atuam no sentido de favorecer a saída de água e eletrólitos do plasma para o tecido intersticial, desenvolvendo o edema. Dentre os fatores de permeabilidade devem ser citadas as aminas vasoativas (histamina e serotonina), a bradicinina, frações C3a e C5a do sistema complemento, leucotrienos, componentes lisossomais de leucócitos, metabólitos do oxigênio, várias citocinas e outros (Garcia-Leme, 1989). Em peixes, o modo de ação desses mediadores farmacológicos não é bem caracterizado, havendo dúvidas se todos seriam encontrados e, se encontrados, atuariam da mesma forma.

Eventos celulares na inflamação aguda

A perda de líquido rico em proteínas, devido ao aumento de permeabilidade vascular, resulta em maior concentração de eritrócitos no meio intravascular, aumentando a viscosidade sanguínea, que leva à perda do fluxo axial chegando até a estase da corrente circulatória. Aliado a esse

evento ocorre aumento da adesividade entre os eritrócitos, que começam a formar agregados. A perda do fluxo axial e os agregados de eritrócitos, que passam a ter uma massa maior que a dos leucócitos, empurra-os para a periferia do fluxo sanguíneo, acarretando o fenômeno da marginação leucocitária. Nos peixes esse efeito, embora não seja caracterizado, pode ser diferente em função do maior tamanho dos eritrócitos em relação aos leucócitos e pelo fato dos eritrócitos serem nucleados, mas isso é preciso ser investigado.

Os leucócitos passam então a rolar pelo endotélio vascular e vão gradativamente tornando-se mais aderentes, até que se fixam a ele, através das chamadas moléculas de adesão, presentes tanto nas células brancas como nas endoteliais. Na fase posterior, os leucócitos inserem seus pseudópodos por entre as células endoteliais, e, a seguir, arrastam para fora do vaso o restante do corpo celular. Esse último fenômeno é conhecido como *diapedese*. Uma vez fora dos vasos os leucócitos migram para o foco inflamado, por meio do mecanismo conhecido como quimiotaxia. Uma vez no sítio lesado as células competentes procuram remover o agente agressor por meio da fagocitose e degranulação.

Quimiotaxia é definida como a migração unidirecional de células, mediante um gradiente químico de concentração de fatores atratores denominados *quimiotaxinas*. Dentre elas, destacam-se a fração C5a e C3b do sistema complemento, o leucotrieno B4 derivado do ácido araquidônico e o fator ativador de plaquetas entre os mais potentes agentes quimiotáxicos. Além desses, várias citocinas podem contribuir para a quimiotaxia.

Quimiocinese, ao contrário, indica a migração de células ao acaso ou aleatória sem direção. Então, após a diapedese os leucócitos passam a fazer a quimiotaxia até o foco inflamado, onde se acumulam.

Quando as quimiotaxinas ocupam cerca de 20% dos receptores presentes na membrana dos leucócitos estimulam a quimiotaxia. A ocupação de receptores de membrana ativa a Fosfolipase C, que hidrolisa fosfolipídios de membrana, resultando na formação de inositol. Este por sua vez promove a liberação de cálcio (Ca^{++}) dos reservatórios intracelulares, resultando em aumento do Ca^{++} iônico citosólico, que por sua vez estimula os elementos contráteis da célula, resultando em quimiotaxia e na emissão de pseudópodos na fagocitose (Garcia Leme, 1989).

Do acúmulo de leucócitos no foco inflamatório resulta a fagocitose, processo pelo qual os micro-organismos invasores são internalizados, mortos e digeridos. O fenômeno envolve três eventos inter-relacionados:

1) **Reconhecimento e fixação**: a maioria dos micro-organismos somente é reconhecida quando revestidos de opsoninas, das quais, as principais são a fração do sistema complemento C3b, a IgG e a proteína C reativa. Quando opsonizadas as partículas ligam-se a receptores específicos na superfície do fagócito (Nakanishi et al., 1991; Matsuyama et al. 1992; Rose & Levine 1992; Lamas & Ellis, 1994a);
2) **Endocitose**: é a internalização da partícula opsonizada desencadeada após o reconhecimento, fixação e estimulação dos receptores de membrana. Então o fagócito lança seus pseudópodos que irão circundar a partícula-alvo, de modo que a membrana celular venha a formar uma saculação citoplasmática, denominada fagossoma (Lamas & Ellis, 1994a). Após o processo de internalização da partícula, a membrana do fagossoma

une-se à membrana lisossomal, formando o fagolisossoma, onde é desencadeada a atividade microbicida seguida da digestão do material fagocitado, pela descarga do conteúdo dos grânulos lisossomais. O processo requer a participação ativa de proteínas do citoesqueleto, em especial a actina (Kodama et al., 1994) e de cálcio. Todos esses passos são dependentes de ATP, ou seja, a célula deve estar metabolicamente ativa. Os neutrófilos produzem ATP a partir da glicólise e da glicogenólise, enquanto que os macrófagos o fazem via fosforilação oxidativa. Toda essa movimentação de pseudópodos, formação de fagossoma e fagolisossoma requer eventos bioquímicos similares aos descritos para quimiotaxia, desde a ligação do receptor ao elemento reagente até os efeitos do Ca^{++} iônico sobre a movimentação do citoesqueleto.

3) **Atividade microbicida e degradação**: após a formação do fagolisossoma, quando o elemento fagocitado é um micro-organismo, é necessário que seja morto para em seguida ser digerido. São dois os mecanismos microbicidas mais conhecidos: dependente e independente de oxigênio.

O mecanismo *dependente de oxigênio* lança mão do efeito de radicais tóxicos do oxigênio como principal arma mortal contra os micro-organismos. Esses radicais tóxicos são formados durante a fagocitose que estimula o surto oxidativo no fagócito, aumento do consumo de oxigênio, glicogenólise aumento da oxidação da glicose via hexose monofosfato e a produção dos chamados metabólitos ativos do oxigênio. Os últimos resultam da ativação da NDPH oxidase que oxida o NADPH e, reduz o oxigênio em íon superóxido, que a seguir é transformado em H_2O_2 (Segal & Abo, 1993; Secombes & Fletcher, 1992). No s*istema H_2O_2-mieloperoxidase* (MPO) a enzima está contida nos grânulos azurófilos de neutrófilos e em presença de Cl^- converte H_2O_2 em $HOCl^-$, potente agente oxidante e antimicrobiano, o mais eficiente presente em neutrófilos. No *sistema independente de mieloperoxidase* os leucócitos são capazes de matar bactérias, embora o façam de modo mais lento, necessitando de oxigênio, pois os radicais hidroxila e o íon superóxido estão implicados nesse mecanismo. Os dois radicais são produzidos pelo aumento do metabolismo oxidativo durante a fagocitose. Macrófagos ativados também produzem H_2O_2, mas não contém MPO (Cotran et al., 2004).

O *mecanismo independente de oxigênio*, como o nome sugere, independe de surto oxidativo e a morte do microrganismo ingerido ocorre pela ação de diferentes proteínas, tais como *lisozima*, *lactoferrina* e outras que atuam aumentando a permeabilidade da parede celular das bactérias e que são descarregadas do lisossoma para dentro do fagolisossoma, após a fusão das membranas. As hidrolases ácidas presentes também nos grânulos azurófilos promovem a degradação dos microrganismos no interior do fagolisossoma, cujo pH torna-se ácido e ideal para a ação de tais enzimas (Cotran et al., 2004). A ação de citocinas como o fator de necrose tumoral também está envolvida nesse mecanismo (Jang et al., 1995, 1996).

Existem algumas evidências de que o superóxido produzido pelos macrófagos de peixes não sejam particularmente tóxicos para bactérias patogênicas, mas o peróxido de hidrogênio e seus derivados é que exerceriam a atividade microbicida mais importante, mesmo quando a reação é extracelular (Hardie et al., 1996).

Da mesma forma que a fagocitose, a opsonização de micro-organismos por anticorpos ou frações do sistema complemento, induz ao aumento da produção de radicais livres do oxigênio e resposta mais rápida dos fagócitos, como verificado com neutrófilos de salmão do Atlântico incubados com *Aeromonas salmonicida* (Lamas & Ellis, 1994b).

Atividade microbicida dependente de espécies reativas de nitrogênio

Há evidências de que os peixes sejam capazes de gerar espécies reativas de nitrogênio como o óxido nítrico (ON), pela ação da arginina sintetase (AON), sendo demonstrado no sistema nervoso e cérebro do salmão do Atlântico e truta arco-íris (Schober et al., 1993). Atividade AON foi demonstrada em leucócitos do rim cefálico do bagre do canal, após a inoculação intraperitoneal de *Edwardsiella ictaluri*, mas não foi possível identificar a célula responsável pela atividade AON (Schoor & Plumb, 1994). Em mamíferos está demonstrado que o ON, embora participe da destruição de agentes patógenos, apenas inicia ações deletérias como a peroxidação lipídica. Todavia, este induz formação de outros derivados mais potentes como hidroxilas, dióxido de nitrogênio e outros (Hibbs, 1992).

Vale frisar que nem sempre que uma dada bactéria é fagocitada ela será morta e digerida. Há casos em que o micro-organismo fagocitado não é morto, sendo rapidamente expulso da célula por exocitose. Em outros casos, a bactéria é fagocitada e desenvolve-se o processo de simbiose em que a célula convive com o micro-organismo no seu citoplasma, transportando-o pelo organismo e disseminando a infecção. Este é o caso de micobactérias, brucelas e outras que passam a viver no interior de macrófagos. É de conhecimento que a *Salmonella typhimurium* produz super-óxido-dismutase que anula o efeito bactericida do íon superóxido. Em outros casos, a célula fagocita o micro-organismo, não consegue matá-lo e este passa a se multiplicar no citoplasma do fagócito, como é o caso de neutrófilos que fagocitam micobactérias nos estágios iniciais da enfermidade (Majno & Joris, 1996; Cotran et al., 2004). Deve ser levado em conta que a presença da bactéria viva no interior de células brancas (leucócitos) dificulta a cura da enfermidade, pois ela não é atingida por agentes de defesa do hospedeiro ou por drogas, como os antibióticos.

A inflamação em peixes

A fagocitose de eritrócitos de cobaia e de *Bacillus anthracis* por mononucleares peritoneais foi o primeiro fenômeno inflamatório descrito em peixes (Metchinikoff, 1893, 1905; Mesnil, 1895). Posteriormente, vários autores tentaram caracterizar as células presentes na inflamação induzida por vários tipos de flogógenos, em diversas espécies de peixes, em diferentes situações e tempos de observação.

Lesões purulentas associadas com o acúmulo de neutrófilos, liberação de enzimas líticas e necrose tecidual não são descritas em peixes (Secombes, 1996).

Matushima & Mariano (1996) verificaram que a injeção de carragenina na bexiga natatória de tilápias *Oreochromis niloticus* induz reação inflamatória caracterizada por congestão vascular, acúmulo predominante de trombócitos e macrófagos, raros granulócitos e edema. Os autores colheram

de 63% a 90% de trombócitos, respectivamente, após três e 72 horas. Resultados semelhantes foram encontrados utilizando-se o mesmo modelo experimental em *Piaractus mesopotamicus* em que se colheu 53,7% a 83,6% de trombócitos seis horas depois da injeção de carragenina (Martins, 2000; Martins et al., 2006). Nesse caso, o macrófago foi o segundo tipo celular predominante no foco inflamado. Ressalte-se que, em ratos, a injeção do referido flogógeno provoca resposta claramente bifásica, ou seja, após quatro horas observa-se 90% de neutrófilos, percentual que se reduz para 60% após 24 horas e após 48 horas predominam os mononucleares com cerca de 80% do total de leucócitos acumulados (Moraes et al., 1987).

Em *P. mesopotamicus*, a injeção de tioglicolato, LPS e *Aeromonas hydrophila* inativada induz ao acúmulo predominante de trombócitos, seguidos de macrófagos e menor número de linfócitos. Essas proporções foram verificadas seis horas após as injeções, atingiram o máximo após 24 horas e não mais diferiram entre si após 48 horas, como ilustrado nas Tabelas 1 e 2 e Figuras 1 e 2.

Tabela 1. Valores das médias absolutas e erro padrão das médias da contagem de células inflamatórias totais (leucócitos e trombócitos) na bexiga natatória de pacu *Piaractus mesopotamicus* injetados com tioglicolato (Tio); lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, (LPS); *A. hydrophila* inativada (Bactéria).

Variáveis	Tratamentos	Tempos					
		6 horas		24 horas		48 horas	
	Controle	458±339	Ca	120±387	Cab	242±339	Bb
Células Totais	Tio.	3758±339	ABa	2200±339	ABab	717±449	ABb
	LPS	1525±339	Ba	900±339	BCab	208±339	Bb
	Bactéria	2863±339	Aa	3553±339	Aa	1833±339	Aa

Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre os tempos, dentro do mesmo tratamento. Valores seguidos das mesmas letras não diferem do teste de Tukey (P<0,05), (n=96).

Tabela 2. Valores das médias dos percentuais e das médias absolutas e erro padrão das médias da contagem do diferencial das células inflamatórias na bexiga natatória de pacu *Piaractus mesopotamicus* injetados com tioglicolato (Tio); lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, (LPS), *A. hydrophila* inativada (Bactéria).

Variáveis	Tratamentos	Tempos					
		6 horas		24 horas		48 horas	
Granulócitos	Controle	148±89	Aa	64±101	Ca	84±89	Aa
	Tio.	387± 88	Aab	1253±89	Aa	214±117	Ab
	LPS	159±89	Aa	159±89	BCa	59±89	Aa
	Bactéria	204±89	Aa	445±101	ABa	234±89	Aa
Linfócitos	Controle	84±129	Ba	1±48	Bb	98±129	AB
	Tio	1109±12	Aa	557±129	Aa	74±171	ABa
	LPS	421±129	ABa	203±129	Aa	38±171	Bb
	Bactéria	1409±12	Aa	1014±148	Aa	544±171	Aa
Trombócitos	Controle	153±173	Ba	31±198	Bb	32±173	Cab
	Tio.	2121±17	Aa	254±173	Ab	363±229	ABab
	LPS	851±173	ABa	488±173	Aa	74±229	Bbc
	Bactéria	853±173	ABa	1141±198	Aa	967±229	Aa
Macrófagos	Controle	21±58	Aa	2±66	Ba	22±58	Aa
	Tio.	60±58	Aa	106±58	Aab	62±77	Aa
	LPS	36±58	Aa	19±66	Ba	9±77	Aa
	Bactéria	58±58	Aa	955±58	Aa	89±77	Aa

Valores seguidos das mesmas letras não diferem do teste de Tukey ($p<0,05$), ($n=96$), Jaboticabal, 2004. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre os tempos, dentro de um mesmo tratamento.
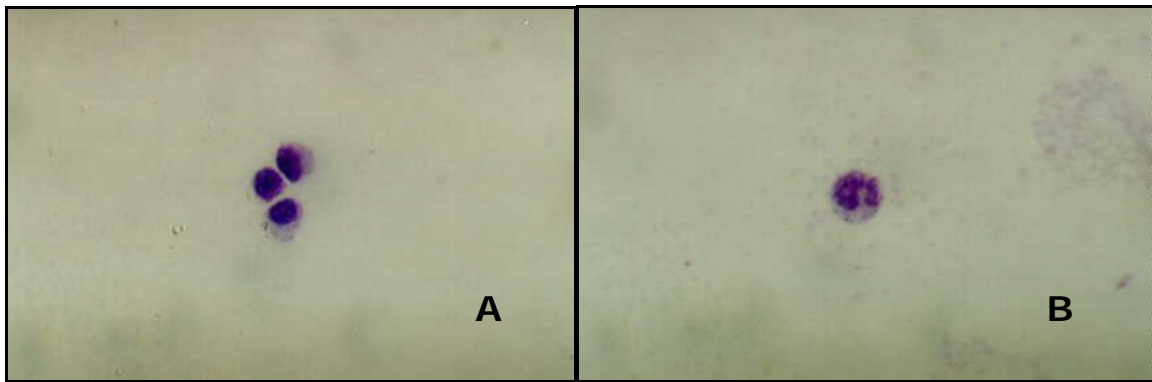
Figura 1. Trombócitos (**A**) e macrófagos (**B**) do exsudato da bexiga natatória de pacu *Piaractus mesopotamicus*, seis horas após injeção de carragenina. Giemsa, 1501 x. Para detalhes ver Martins et al. (2009).
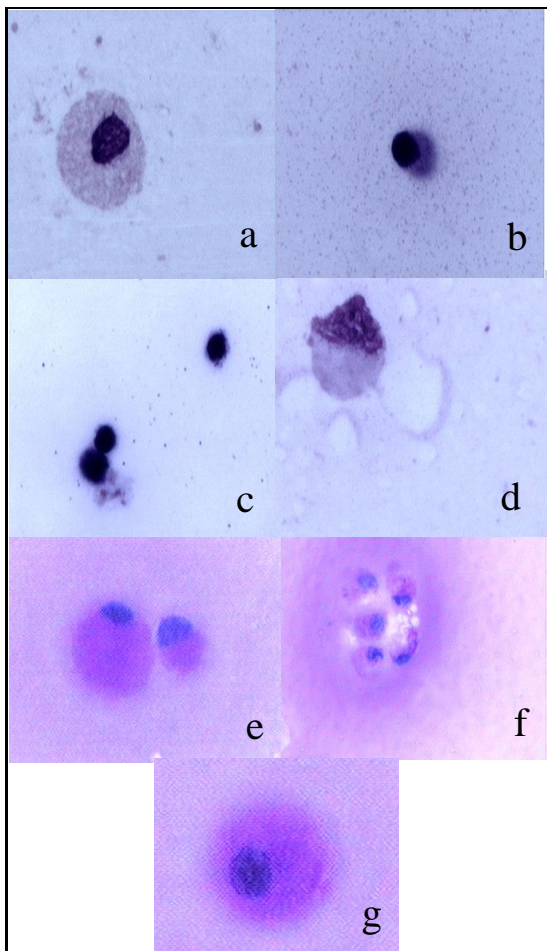
Figura 2. Células do exsudato de *P. mesopotamicus*. (**a**) leucócito granular PAS-positivo seis horas após tioglicolato, coloração com May Grünwald-Giemsa-Wright (MGGW). (**b**) trombócito seis horas após salina (MGGW) 100 x. (**c**) linfócitos seis horas após LPS (MGGW). (**d**) macrófago seis horas após LPS (MGGW). (**e**) leucócito granular PAS-positivo-positivo e trombócito 24 horas após tioglicolato, coloração PAS. (**f**) trombócitos seis horas após tioglicolato. PAS. (**g**) leucócito granular PAS-positivo 24 horas após tioglicolato, coloração PAS+ amilase salivar. Aumento: 100 x. Para detalhes ver Bozzo et al. (2007).

Os pacus que receberam tioglicolato ou *A. hydrophila* apresentaram acúmulo de exsudato na bexiga natatória, de aspecto gelatinoso e coloração amarelada, que não foi observado nos peixes injetados com LPS ou controles. O número de células totais foi de quatro a sete vezes maior após 24 horas nos peixes que receberam tioglicolato ou *A. hydrophila*. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores ao estudar o mesmo fenômeno em outras cavidades de diferentes espécies de peixes (MacArthur et al., 1984; Jorgensen et al., 1993; Martins et al., 2006, 2008). Esses resultados demonstram que o acúmulo de células no foco inflamado em peixes é um fenômeno relevante, embora sua quantidade seja incomparavelmente menor que o observado em ratos (Moraes & Garcia-Leme, 1982; Moraes et al., 1987).

O número de macrófagos no exsudato inflamatório de peixes é baixo (MacArthur et al., 1984; Suzuki, 1986; Afonso et al., 1997). Por outro lado, a injeção de glucano, esqualene glicogênio de ostra ou adjuvante incompleto de Freund resultou em elevadas contagens de trombócitos na cavidade peritoneal (Jorgensen et al., 1993; Vale et al., 2002). Em *Oreochromis niloticus* injetadas com carragenina, o componente celular era constituído por 63,0% de trombócitos e 17,0% de macrófagos, três dias após o estímulo (Matushima & Mariano, 1996). Neste estudo, houve marcada presença de trombócitos ao lado de menor número de linfócitos, macrófagos e granulócitos. Estudos anteriores são controversos nesse aspecto e devem ser consideradas a espécie de peixe, a técnica e agentes flogógenos utilizados, assim como os métodos de colheita, preservação, identificação e contagem das células encontradas. Todos os tipos celulares descritos apresentam funções de interesse quando se consideram os mecanismos de defesa dos peixes (para detalhes ver Bozzo et al., 2007).

Leucócitos, trombócitos e suas funções

Dentre os leucócitos que participam mais ativamente do processo inflamatório em peixes estão os linfócitos, macrófagos e granulócitos, em especial o leucócito granular PAS-positivo (LG-PAS) e os neutrófilos. Os eosinófilos e basófilos têm participação rara e pouco esclarecida. Os trombócitos, embora não sejam células de linhagem leucocitária, participam ativamente do fenômeno.

A – Linfócitos

Sob microscopia de luz comum, os linfócitos são células predominantemente arredondadas e de tamanho variado, com citoplasma basofílico e sem granulações visíveis. O núcleo possui forma arredondada, cromatina densa, sendo elevada a sua relação com o citoplasma. Apresentam projeções citoplamáticas facilitando sua diferenciação em relação aos trombócitos nas extensões. Tais projeções foram descritas em estudos de microscopia de luz (William & Warner, 1976) e de microscopia eletrônica de transmissão (Blaxhal, 1983; Tavares-Dias & Moraes, 2006; 2007).

Linfócitos “pequenos” e “grandes” representam estágios funcionais diferentes da mesma população e não populações distintas (Blaxhall & Daisley, 1973; Ellis, 1977; Guitang, 1998). Células imunocompetentes com

função de defesa (Ellis, 1976; 1977; Houston et al., 1996; Yamamoto et al., 2001), sendo que estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem a presença de linfócitos T citotóxicos em peixes (Nakanishi et al., 1999; Yamamoto et al., 2001) e essa habilidade citotóxica foi descrita em *Sparus aurata* (Meseguer et al., 1994a,b; Cuesta et al., 1999) e *Cyprinus carpio* (Meseguer et al., 1994a; Paliková et al., 1998). Imunoestimuladores como vacinas, leveduras, lipopolissacarídeos e adjuvantes, aumentam a resposta proliferativa de linfócitos T e B e a atividade citotóxica de linfócitos T (Siwick et al., 1998).

Os linfócitos estão sempre presentes no foco inflamatório, embora suas funções ainda não estejam bem esclarecidas (MacArthur et al., 1984; Lamas et al., 1994b). Estudos citoquímicos demonstram reação positiva à fosfatase alcalina em linfócitos de *Oreochromis mossambicus* (Doggett et al., 1987), *Anguilla bicolor* (Prasad & Radhakrishnan, 1992), e *Oreochromis niloticus* (Witten et al., 1998). As fosfatases são enzimas catalizadoras de ésteres de fosfato presentes nos diversos tecidos. Funções diferentes são atribuídas a essas enzimas, de acordo com sua distribuição. Ambas tem papel importante na síntese de proteínas, sendo que a fosfatase alcalina está associada à atividade secretora (Acharya & Panicker, 1998) e a fosfatase ácida ao processo fagocítico (Nakaghi et al., 1995; Acharya & Panicker, 1998).

B - Plasmócitos

Possuem núcleo esférico e citoplasma abundante (Witten et al., 1998), de coloração azul-escura quando coradas com Giemsa (López-Ruiz et al., 1992). Ultraestruturalmente apresentam grande quantidade de cisternas de retículo endoplasmático e complexo de Golgi bem desenvolvido. Nessa população celular são observados poucos grânulos, ribossomos livres e mitocrôndrias (López-Ruiz et al., 1992). À semelhança do que ocorre em mamíferos, os plasmócitos de peixes desenvolvem-se a partir de linfócitos (Boomker, 1981), mas raramente são observados na circulação de peixes. Em *Opisthonema oglinum* (Pitombeira et al., 1968), *Hoplias malabaricus* (Camargo et al., 1986/1987) e *Hypostomus paulinus* (Satake et al., 1989) os plasmócitos do sangue circulante foram denominados de células plasmocitoides, como sugere Jakowska (1956).

C - Monócitos e macrófagos

Ultraestruturalmente o citoplasma dos monócitos contém poucos pseudópodes e grande quantidade de mitocôndrias e de vacúolos, algum retículo endoplasmático e complexo de Golgi. O núcleo ocupa de $^{1}/_{3}$ a $^{1}/_{4}$ da célula (Doggett & Harris, 1989).

Entre as diferentes espécies das famílias Anostomidae, Pimelodidae, Erythrinidae, Ictaluridae, Characidae, Prochilodontidae, Cichlidae, Mugilidae e Cyprinidae, ocorre variação interespecífica quanto ao percentual desse agranulócito. São esféricos, basofílicos, com núcleo em geral excêntrico e alongado ou esférico (Murari et al., 1992; Satake et al., 1994; Tavares-Dias & Moraes, 2006, 2007).

Os monócitos têm atividade fagocitária e a fosfatase ácida, enzima associada à fagocitose, foi citoquimicamente identificada nessas células

(Alaye-Rahy, 1993; Witten et al., 1998). Além disso, apresentam habilidade citotóxica não-específica (Meseguer et al., 1994; Cuesta et al., 1999).

Os monócitos são considerados células em trânsito no sangue (Lorenzi, 1999). Na vigência do processo inflamatório os monócitos migram do sangue para o tecido conectivo, transformando-se em macrófago. Em geral, são células grandes, com citoplasma extenso, rico em mitocôndrias e retículo endoplasmático, sistema de Golgi amplo e lisossomas. Nas inflamações crônicas granulomatosas, como nas micobacterioses, novamente sofrem transformações morfofisiológicas adquirindo aspecto epitelioide ou de células policariontes (Lorenzi, 1999; Matushima, 1994; Petric et al., 2003a). Sua atividade fagocítica foi descrita por vários autores, mas exerce também atividade secretora (Suzuki, 1984; 1986; Lamas et al., 1994). DaMatta et al. (2009) relatam que no *peixe pulmonado da Amazônia*, *Lepidosiren paradoxa*, injetado com tioglicotato 3%, após 6, 36 e 48 horas, 11%, 15% e 16%, respectivamente, dos componentes celulares inflamatórios foram constituídos por essas células mononucleares.

Como células ativamente fagocitárias são processadoras de antígenos, fazendo parte também do sistema imune adquirido, participando do sistema de cooperação com linfócitos na produção de anticorpos.

D – Granulócitos

Os *neutrófilos* de teleósteos são predominantemente arredondados, tendo citoplasma com granulações acidófilas muito finas. O núcleo apresenta, na maioria das vezes, forma de bastonete, em geral, é excêntrico e fusiforme, sendo a cromatina nuclear pouco compacta e sem nucléolo visível. Ultraestruturalmente apresentam citoplasma ocupado por extenso retículo endoplasmático granular, com cisternas paralelas entre si e mitocôndrias. Possui ainda, grande quantidade de grânulos com dimensões, com ou sem estrutura cristaloide interna eletrondensa. O núcleo é oval, excêntrico, eventualmente formando lóbulos incompletos. (Veiga et al., 2000; Tavares-Dias & Moraes, 2007).

Estudos citoquímicos demonstraram que os grânulos de neutrófilos de diferentes espécies de peixes apresentam glicogênio, peroxidase, proteínas básicas e lipídios (Veiga et al., 2000; Ueda et al., 2001), substâncias importantes para a defesa imunológica.

Alguns pesquisadores, ao invés de neutrófilos, relatam a ocorrência de *heterófilos* em teleósteos de 17 famílias (Saunders, 1966), em agnatas, em cartilaginosos (Barber & Westermann, 1978), em *Ictalurus punctatus* (Cannon et al., 1980), em carpas (Stoskopf, 1993), *Carassius auratus* (Stoskopf, 1993; Zinkl et al., 1991), em *Oncorhynchus mykiss* (Houston et al., 1996). Porém, no sangue periférico de espécies como *Hoplosternum littorale* (Tavares-Dias & Barcellos, 2005), *Brycon orbignyanus* (Tavares-Dias & Moraes, 2006) *e Brycon amazonicus* (Tavares-Dias et al., 2008) ocorre tanto neutrófilos como heterófilos. Os heterófilos apresentam grânulos citoplasmáticos que se coram de modo intermediário entre a coloração de eosinófilo e basófilo, enquanto que os neutrófilos apresentam grânulos de coloração tipicamente neutrofílica (Tavares-Dias & Barcellos, 2005; Tavares-Dias & Moraes, 2006; Tavares-Dias et al., 2008). Contudo, os heterófilos possuem funções equivalentes aos neutrófilos (Garcia-Navarro & Pachaly,

1994) e no *Carassius auratus* apresenta reação positiva ao PAS, fosfatase ácida e alcalina, esterases, Sudan black (Zinkl et al., 1991).

O leucócito granular PAS-positivo, assim denominado por apresentar forte coloração ao ácido periódico de Schiff (PAS), foi considerado precursor de basófilo/mastócito, com possível presença heparina (Barber & Westerman, 1978). Porém, leucócitos com tais características citoquímicas têm sido descritos em outros peixes e recebido outras denominações. Também foram referidos como *célula reticular* (Moura et al., 1994), *neutrófilos tipo 1* (Roubal, 1986), *células granulocíticas especiais ou* CGE (Ribeiro, 1978) e *polimorfo-agranulocítico* (DaMatta et al., 2009). Todavia, o consenso está favorecendo a denominação leucócito granular PAS-positivo ou LG-PAS.

Contudo, independente da denominação, esses granulócitos são descritos como grandes e semelhantes aos neutrófilos, cujo citoplasma se cora fracamente por corante ácido ou básico. O núcleo é pequeno, excêntrico, contém cromatina densa e não se observa nucléolo. De acordo com Ribeiro & Valeri (1976), o retículo endoplasmático granular é bem desenvolvido, apresentando cisternas longas e curtas, muitos ribossomos livres, poucas mitocôndrias. No núcleo predomina a heterocromatina e não há nucléolo. Mas, a sua função ainda não está esclarecida. Martins et al. (2006) relatam elevado percentual dessas células circulantes em *P. mesopotamicus* injetados com carragenina, um polissacarídeo derivado do musgo irlandês, classicamente utilizado como agente flogógeno em estudos de inflamação.

Os *eosinófilos* são células arredondadas e relativamente pequenas se comparadas aos neutrófilos. O citoplasma é ocupado por grânulos acidófilos polimórficos, o núcleo excêntrico, com cromatina compacta e coloração rosa-alaranjada, evidenciada por corantes ácido-básica.

Ultraestruturalmente os eosinófilos apresentam citoplasma escasso, superfície irregular, muitas vezes com vesículas translúcidas. Possuem ainda, projeções que levam à formação de pseudópodos, poucas organelas e muitos grânulos citoplasmáticos, os quais possuem cristaloides em formato esférico ou em bastão. O núcleo é elíptico com predominância de eucromatina e com heterocromatina colada à membrana nuclear interna (Veiga et al., 2000).

Em peixes, as funções dos eosinófilos ainda estão por ser esclarecidas. À semelhança dos mamíferos, ocorrem em elevado percentual em peixes portadores de parasitoses (Ranzani-Paiva et al., 1987; Ranzani-Paiva et al., 1998/1999). Em mamíferos os eosinófilos podem exercer função fagocítica, mas não o fazem com a mesma avidez dos neutrófilos (Lorenzi, 1999).

No sangue de *O. niloticus* os eosinófilos fagocitam partículas de zimosan e são as últimas a surgir durante o processo inflamatório (Suzuki, 1986). Além disso, nesta espécie de tilápia esses leucócitos apresentaram proteínas básicas, sudanofilia e peroxidase após colorações citoquímicas (Ueda et al., 2001). Estudos ultraestruturais relatam fagocitose de bactérias por eosinófilos do exsudato peritoneal (Bodammer, 1986) e estudos citoquímicos demonstram reação positiva para peroxidase (Alaye-Rahy, 1993; Meseguer et al., 1994b). Recentemente, DaMatta et al. (2009) demonstraram que no *peixe pulmonado da Amazônia*, *L. paradoxa*, injetado com tioglicotato 3%, após 6, 36 e 48 horas, o principal componente celular inflamatório foi constituído por granulócitos denominados tipo II (87%, 85% e 84%, respectivamente), leucócitos com fortes evidências morfológicas de eosinófilos.

E - Trombócitos

Ao microscópio de luz comum os trombócitos têm núcleo fusiforme e hipercorado. Algumas vezes o citoplasma é escasso, não sendo possível sua observação, outras vezes pode ser hialino ou ligeiramente acidófilo, diferente do observado em pequenos linfócitos. Em geral, os trombócitos são predominantemente elipsoides, ocasionalmente ovais ou fusiformes. Os trombócitos coram-se de magenta pelo PAS, indicando o glicogênio no citoplasma, enquanto linfócitos são negativos, comportamento semelhante ao observado nessas mesmas células do sangue para a mesma espécie (Tavares-Dias & Moraes, 2007; Tavares-Dias et al., 2007).

Ultraestruturalmente apresentam invaginações e prolongamentos citoplasmáticos digitiformes. Raramente observa-se complexo de Golgi definido e vacuolização pode ser observada, o que o difere dos linfócitos (Ribeiro & Valeri, 1976). O citoplasma contém sistema canalicular, numerosos vacúolos, grânulos difusos de glicogênio e restos de material fagocitado. Na superfície celular, projeções digitiformes e poucos ribossomos livres podem ser observados. A cromatina é formada exclusivamente por heterocromatina tornando difícil a visualização do nucléolo (Tavares-Dias & Moraes, 2007).

Os trombócitos são células sanguíneas encontradas em aves, répteis, anfíbios e peixes cuja função na coagulação sanguínea e na homeostasia são bem descritas (Roberts, 1981; Penha et al., 1996; Beletti et al., 1998).

Devido à elevada ocorrência de trombócitos no sangue (Hickey Jr, 1982; Wiik et al., 1989; Wojtaszek, 1991; Penha et al., 1996; Tavares-Dias et al., 1999 a,b,c), a presença de enzimas envolvidas nos processos fagocíticos (Moura et al.,1997; Tavares-Dias et al., 2007), a aderência a *A. hydrophila* (Kozinska et al., 1999 a,b,c), presença marcante na inflamação (Matushima & Mariano, 1996; Martins et al., 2006; Bozzo et al., 2007) e sua atividade fagocitária (Slierendrecht et al., 1995; Hill & Rowley, 1996; Burrows et al., 2001; Stosik et al., 2001; Kolman et al., 2003), sugerem sua função como célula de defesa orgânica em diferentes espécies de vertebrados não mamíferos.

Matushima & Mariano (1996), estudando a cinética celular em exsudato inflamatório da bexiga natatória de *O. niloticus*, induzido pela carragenina, observaram que a migração de células para o órgão foi predominantemente de trombócitos. Em *P. mesopotamicus* ocorre o mesmo (Reque, 2005; Martins et al., 2006; Bozzo et al., 2007). Porém, na cavidade peritoneal de *Oncorhynchus mykiss* sem qualquer estímulo os trombócitos só raramente são observados (Afonso et al., 1997).

Nakaghi et al. (1995) demonstraram que os trombócitos de pacu *P. mesopotamicus* apresentam reação positiva para fosfatase ácida, enzima com atividade digestiva e peroxidase, enzima com atividade oxidativa nos processos de fagocitose. Concluíram que a presença dessas enzimas e de fagolisossomos é sugestiva de que os trombócitos possivelmente participam da depuração ("clearence") do sangue através de ingestão e digestão de partículas.

Reação positiva para fosfatase ácida é observada em trombócitos de várias espécies de peixes (Page; Rowley, 1983; Hine et al., 1986; Alaye-Rahy, 1993). Corroborando essas afirmações Tavares-Dias et al. (2007),

demonstraram no sangue de tambaqui *Colossoma macropomum* a fagocitose de restos celulares por trombócitos (Figura 3A-B). Há evidências de que os trombócitos contenham substâncias importantes para a fagocitose como glicogênio (Zinkl et al., 1991; Affonso et al., 2000; Ueda et al., 2001; Passantino et al., 2005; Tavares-Dias & Barcellos, 2005;Tavares-Dias, 2006), fosfatase ácida (Zinkl et al., 1991; Schütt et al.,1997) e alcalina (Zinkl et al., 1991; Passantino et al., 2005) e peroxidase (Daimon et al., 1985). Tavares-Dias et al. (2007) caracterizaram os trombócitos de *C. macropomum* e *Prochilodus lineatus* por técnicas citoquímicas e ultraestruturais e demonstraram evidências de digestão de resíduos celulares por trombócitos. Os mecanismos de imunidade específica em peixes e outros vertebrados filogeneticamente menos desenvolvidos, à luz dos conhecimentos atuais, são pouco eficientes em relação ao observado em mamíferos e aves (Stosik et al., 2001). Então, os mecanismos de defesa orgânica não específicos têm papel fundamental e mais relevante na resistência contra agressões de fatores patogênicos e ambientais (Stosik et al., 2001; Passantino et al., 2005). Trombócitos de peixes podem ser o elemento de ligação entre os mecanismos de defesa inato e adaptativo (Passantino et al., 2005), e expressar moléculas de superfície e intracelulares envolvidas na função imune (Köllner et al., 2004).

Hill & Rowley (1996) sugerem que os trombócitos de peixes à semelhança das células homeostáticas ancestrais em deuterostômios superiores, como os tunicatas e equinodermatas, possuem função fagocítica e homeostática agregatória ajudando a manter os peixes livres de patógenos após dano vascular. Alguns aspectos dessa dualidade funcional podem ter sido perdidos nos mamíferos, com a evolução das plaquetas anucleadas.
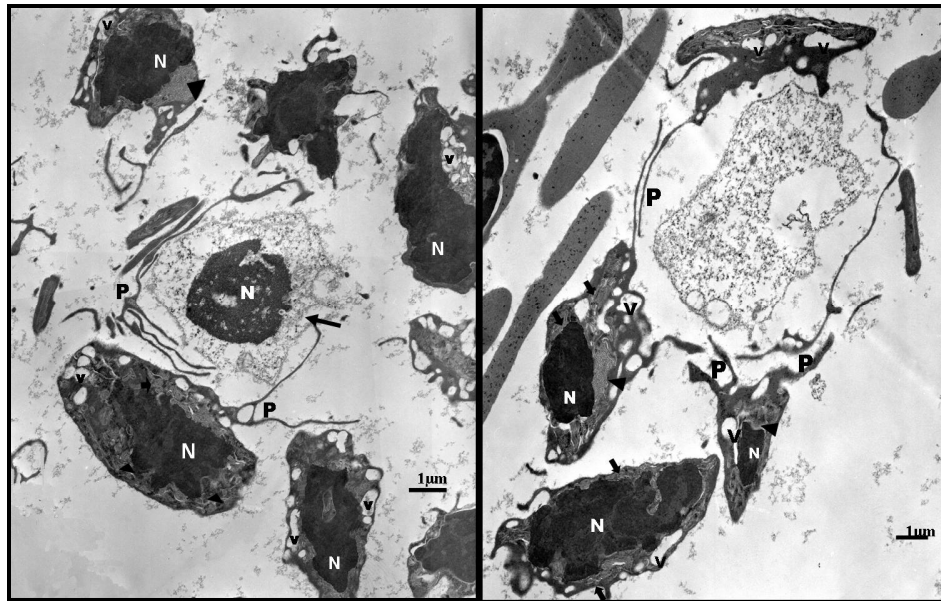
Figura 3. Trombócitos de tambaqui *C. macropomum* apresentando aglomerados de glicogênio (▲), vaculos (V), sistema canalicular (seta menor), e projeções (P) da superfície celular com suas projeções sobre os restos celulares (seta maior) contendo o núcleo celular (N). Tavares-Dias et al. (2007).

Corticosteroides endógenos na inflamação

Os glicocorticoides têm papel relevante na manutenção da integridade funcional da microcirculação, pois potenciam o desenvolvimento de tensão nas células musculares lisas dos vasos induzida por agentes vasoativos ou inibem a ação vasoconstrictora de fatores vasoativos endógenos. Controla a atividade celular na inflamação aguda em várias de suas ações Assim, os efeitos de aminas vasoativas, eisosanoides e citocinas podem ser suprimidos quando a concentração de corticosteroides plasmáticos está elevada. Os glicocorticoides estimulam a produção de lipocortina que inibe a atividade da fosfolipase A2, bloqueando a síntese de eicosanoides e de FAP (Flower, 1986) Além disso, os glicocorticoides podem bloquear a liberação de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral e a interleucina 1, por macrófagos (Dinarello, 1984) e a adesão de leucócitos ao endotélio vascular inibindo sua migração (Flower, 1986). Assim, corticosteroides endógenos atuam como homônios anti-inflamatórios.

O estresse provoca a hipercortisolemia que por sua vez determina a depressão dos mecanismos de defesa inflamatórios, linfocitopenia e neutroflia.

Martins et al. (2006) avaliaram a inflamação aguda induzida na bexiga natatória de pacu *P. mesopotamicus* pela injeção de carragenina (500 μg), após estímulos consecutivos de captura. Seis horas depois da aplicação do estímulo inflamatório, nos peixes submetidos aos estímulos consecutivos de captura injetados com solução salina, não foram observadas diferenças significativas. Mas nos estressados que receberam carragenina o acúmulo de células totais foi significativamente maior do que nos não estressados ($p>0,05$). Dente as células acumuladas esse aumento foi devido ao maior número de trombócitos. Os valores médios de granulócitos, linfócitos e macrófagos não diferiram entre os tratamentos. Esses valores podem ser explicados pela menor concentração plasmática de cortisol nos peixes submetidos aos estímulos repetitivos de captura, após o terceiro estímulo, bem como aumento na glicemia após o segundo estímulo (Tabela 3 e Figura 4).

Tabela 3. Valores médios e análise estatística das contagens diferenciais de leucócitos e trombócitos (%) e de células totais acumuladas (número/μL) no exsudato da bexiga natatória de *P. mesopotamicus*, seis horas após injeções solução salina ou carragenina.

Parameters	Treatment	Stressed Group	Non-stressed group	F test for group	F test for treatment	C.V.
Granulocytes	Control	1.00 aA	2.44 aA	0.30	0.79	66.80
	Carrageenin	3.90 aA	2.33 aA			
Lymphocytes	Control	0.44 aA	1.00 aA	3,24	2,85**	58.08
	Carrageenin	7.10 aA	1.90 aA			
Macrophages	Control	5.44 aA	2.80 bA	0.00	8.22**	48.47
	Carrageenin	9.50 aA	31.09 aA			
Thrombocytes	Control	38.33 bA	8.56 bB	7.32**	60.75**	32.91
	Carrageenin	79.50 aA	63.86 aA			
Total leucocytes	Control	281.80 bA	424.00 bA	14.23	23.29**	17.59
	Carrageenin	7,745.80 aA	3,767.50 aB			
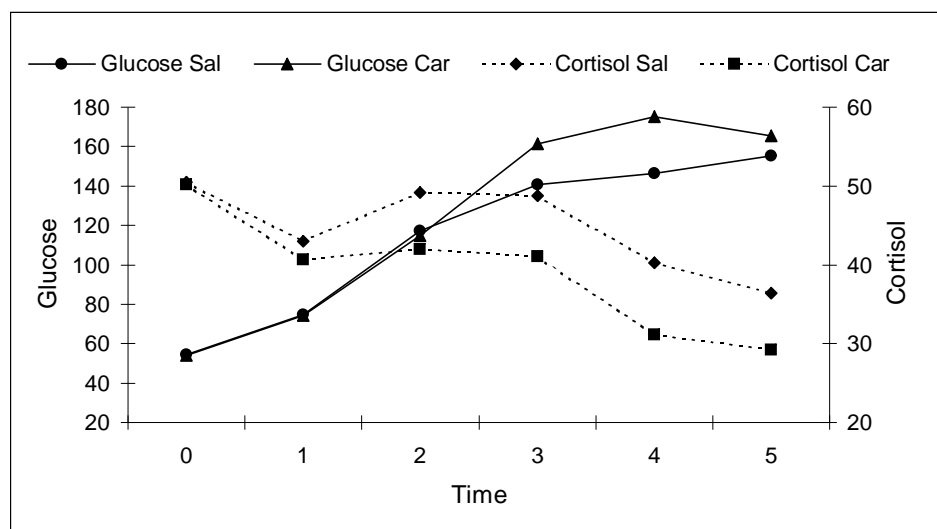
Figura 4. Valores médios da glicemia (mg/100 ml) e cortisol plasmático (µg/dl) em *P. mesopotamicus* após a injeção de 0,5 ml solução salina (Sal) ou 500 μg carragenina (Car) em diferentes tempos. *diferenças significativas entre os diferentes tempos de amostragem para cada variável ($p<0.05$).

Esses resultados demonstram que o número de células presentes no foco lesado aumentou proporcionalmente à redução da concentração plasmática de cortisol. Resultados similares de determinações de cortisol plasmático foram observados anteriormente na mesma espécie de peixe (Martins et al., 2006). De acordo com Martins et al. (2000) seis horas após os estímulos estressante em pacus ocorreu redução da concentração de cortisol. Mccormick et al. (1998) também observaram fenômeno semelhante três horas após o estímulo em salmão do Atlântico, ao contrário do verificado por Fevolden et al. (1992) e Mcdonald & Milligan (1997).

Em ratos, fatores produzidos no sítio inflamado alcançam a corrente circulatória e provocam a liberação de corticosterona, via eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, inibindo o desenvolvimento da inflamação aguda (Garcia Leme & Shapoval, 1975; Moraes & Garcia leme, 1982). Nessa situação a aplicação de carragenina como estímulo inflamatório induz a elevação da corticosterona plasmática (Moraes & Garcia Leme, 1982). Nesses animais o aumento dos teores de corticosterona no sangue reduz a adesão de leucócitos ao endotélio vascular, a diapedese e a quimiotaxia, limitando o acúmulo de leucócitos no foco inflamado (Farsky et al., 1995). Assim, esse mesmo comportamento é possível em peixes, com menor acúmulo de células no sítio inflamado devido à maior liberação de cortisol ou, como verificado neste trabalho, menor lberação de cortisol permite maior acúmulo de células inflamadas no síitio lesado. Ou seja, os estímulos consecutivos de captura associados à injeção de carragenina não foram suficientes para elevar a concentração plasmática de cortisol. A razão dessa falha não foi identificada, mas o incremento da resposta celular no processo inflamatório foi coerente com a diminuição dos níveis hormonais observados. Para maior clareza ver Martins et al. (2006).

O efeito das concentrações de cortisol sobre o metabolismo de carboidratos não foi bem claro, mas foi semelhante ao observado por outros autores em outras espécies de peixes (Davis et al., 1985; Leatherland, 1987; Tam et al., 1988; Andersen et al., 1991; Vijayan et al., 1994). De acordo com Mommsen et al. (1999), as concentrações plasmáticas de glicose estão sujeitas a variações na dependência do padrão fisiológico do hospedeiro. Em peixes, quando a concentração de cortisol é mais alta que o normal, a glicemia pode aumentar, diminuir ou permanecer inalterada, sendo influenciada por vários fatores que podem mascarar alguns efeitos da variação hormonal (Mommsen et al., 1999).

A inflamação crônica

Quando o agente causal persiste ou por qualquer outra razão o processo não se resolve de forma rápida e satisfatória, ocorre a cronificação da inflamação que se caracteriza pela proliferação de células mononucleares (macrófagos, linfócitos e outras), tecido conectivo e vasos neoformados, estes últimos necessários para irrigar o processo em desenvolvimento. Esse tipo de reação é inespecífico e ocorre nas mais variadas condições.

Outra forma de evolução é o desenvolvimento da reação inflamatória crônica granulomatosa, que é reação específica e dependente do sistema imune. Nesse caso formam-se nódulos que contem tecido conectivo macrófagos, trombócitos, eosinófilos. Esse aspecto é característico da

tuberculose, nocardiose e várias doenças causadas por fungos que geram hipersensibilidade.

Nesse último caso, pode se estabelecer no órgão ou tecido afetado, um processo com determinadas características peculiares, que dependem das propriedades específicas do parasito e do hospedeiro, conhecido como reação inflamatória granulomatosa, descrita há mais de 100 anos por Virchow.

A inflamação granulomatosa é o substrato morfológico de muitas doenças infecciosas, sendo que em peixes é descrita na infecção por flavobactérias (Klluge, 1965), na tuberculose em *Pleuronectes platessa* (Timur et al., 1977a); na infecção por *Edwardisiella tarda* (Miyazaki & Kaige, 1985); no parasitismo por *Pseudoterranova decipiens* em trutas *O. mykiss* e *Gadus morhua* (Ramakrishna & Burt, 1991); por *Mycrosporidium sp* na musculatura esquelética de *Trisopterus esmarkii* (Puslford & Matheus, 1991); e pela inoculação de BCG em *O. niloticus* (Matushima, 1994).

Substâncias inertes também induzem o desenvolvimento de inflamação crônica, não imune, como na injeção de sílica no tecido muscular de *Gadus morthua* e *C. auratus* que provoca lesão proliferativa, constituída por macrófagos, linfócitos e marcada fibroplasia (Jansson & Waaler, 1967), pela injeção de carragenina em *P. platessa* (Timur et al., 1977b), pelo implante de tecido ósseo de desmineralizado de *Anguilla anguilla* em tecido muscular de *Scyliorhinus canicula* (Peingnou-Deville et al., 1989); pelo implante de lamínulas de vidro no tecido subcutâneo de *P. mesopotamicus* (Petric et al., 2003a).

Em mamíferos os granulomas induzidos experimentalmente desenvolvem-se de forma relativamente padronizada, havendo algumas poucas variações na dependência do agente lesivo e do estado geral do hospedeiro. Assim, o granuloma induzido pelo *Micobcaterium tuberculosis* é caracterizado por uma coleção focal de células mononucleares circundada por tecido conectivo constituído por fibroblastos, fibras colágenas e vasos neoformados. Um halo de pequenas células arredondadas, incluindo monócitos recém-chegados e pequeno número de linfócitos, pode ser observado entre a camada conectiva e o foco da lesão. Células mononucleares grandes, com arranjo em paliçada ocupando o centro da lesão, e que exibem citoplasma grande e núcleo com cromatina dispersa, são caracterizadas como células epitelioides. A porção central pode ser ocupada por uma zona de necrose caseosa. A característica morfológica básica da inflamação granulomatosa é a ocorrência de células epitelioides e a deposição concêntrica da lesão total (Mariano, 1995).

De acordo com os agentes que os induzem, os granulomas podem ser divididos em duas grandes categorias: o primeiro tipo é causado por substâncias destituídas de atividade antigênica e incapazes de suscitar resposta imune. São designados como granulomas *tipo corpo estranho* e, embora não resultem de resposta imune, suas propriedades químicas são capazes de gerar uma reação que pouco difere na evolução, dinâmica, duração, severidade e involução daqueles provocados por agentes infecciosos. O espectro da resposta varia entre quiescente e discreto, como os induzidos por bentonita e carragenina, de um lado, e vigoroso a severo, como os provocados por sílica ou parede celular de estreptococos. A segunda categoria de granulomas são aqueles produzidos por agentes dotados de propriedades antigênicas específicas. Entre eles incluem-se bactérias, fungos,

vírus, protozoários e alguns metais como o zircônio e o berílio. Todos esses agentes, apesar da sua diversidade, tem uma propriedade em comum que é o fato de serem de difícil degradação (Mariano, 1995).

Examinando lesões provocadas pela larva encapsulada L3 de *Pseudoterranova decipiens* em trutas *O. mykiss* infectadas experimentalmente, Ramakrishna & Burt (1991) descreveram inflamações granulomatosas com presença de células gigantes somente em trutas. Células gigantes tipo corpo estranho e tipo Langhans surgiram 32 dias pós-infecção, adjacentes ao parasito, logo acima da camada de células epitelioides, muitas das quais apresentavam dois ou mais núcleos sugerindo que a formação de células gigantes se inicia com a união de células epitelioides.

Matushima (1994) inoculou BCG para estudar o desenvolvimento de granuloma com propriedades antigênicas em tilápias do Nilo *O. niloticus* e verificou, após três dias, a presença de edema intersticial e extenso infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, constituído por macrófagos, havendo ainda escassos gigantócitos do tipo corpo estranho. Trombócitos também estavam presentes. Com a evolução da lesão ocorreu diminuição dos fenômenos vasculares, aumento do infiltrado inflamatório com predominância mononuclear. Os macrófagos e trombócitos apresentavam distribuição heterogênea. O primeiro aparecia em toda a área lesada como parte do granuloma e no interstício, sendo positivos para citoqueratina, fato que os caracteriza como célula epitelioide. Os trombócitos participavam exclusivamente do insterstício da lesão, não sendo observados no granuloma. Grumos de BCG estavam no centro da lesão, havendo bacilos intracitoplasmáticos. Em tempos mais tardios, observou-se maior quantidade de gigantócitos do tipo corpo estranho, eosinófilos e, distribuídos aleatoriamente pela lesão, melanomacrófagos. A cápsula dos granulomas era composta de tecido conectivo contendo fibras colágenas dos tipos I e III. Com o tempo os melanomacrófagos circunscreveram a lesão sendo bem evidenciados. Externamente à camada de células pigmentares havia trombócitos, linfócitos, macrófagos epitelioides, eosinófilos e fibroblastos. Não foram observados gigantócitos do tipo Langhans.

Em estudo com *Arius* sp. inoculados com BCG, Sado & Matushima (2008) verificaram que a formação de células gigantes a partir de macrófagos é tempo dependente, corroborando as observações anteriores e que houve uma resposta inflamatória difusa, composta predominantemente por células mononucleares, sem formação de granulomas, mas com predomínio de células gigantes.

Petric et al. (2003a) implantaram lamínulas de vidro no tecido subcutâneo de *Piaractus mesopotamicus* para estudar a cinética do desenvolvimento de granuloma do tipo corpo estranho. Depois de três dias de implante foram colhidas, lavadas para remoção do material não aderente e coradas com hematoxilina-eosina, o que permitiu a observação de muitos macrófagos aderidos à lamínula e raros gigantócitos binucleados. Depois de sete dias, havia maior número de macrófagos isolados e era perceptível sua maior organização e havia predomínio de células gigantes do tipo corpo estranho. Estas possuíam os seus núcleos distribuídos ao acaso pelo citoplasma, característico de gigantócitos do tipo corpo estranho (Figura 5). Nesse tempo, além dos gigantócitos do tipo corpo estranho, estavam

presentes outras células cujos núcleos estavam dispostos na periferia do citoplasma conferindo aspecto de "coroa". Essas células foram classificadas como do tipo Langhans (Figura 5). Nas observações realizadas após 14 dias, o número de gigantócitos do tipo Langhans era maior que os do tipo corpo estranho e a quantidade de macrófagos isolados havia se estabilizado.

Aos 30 dias após o implante, não era possível individualizar as células gigantes, graças à intensa proliferação fibroblástica formando uma cápsula constituída também por fibrócitos, colágeno, mononucleares e neovasos. Aos 45 dias não mais se observou a presença de gigantócitos, mas sim de cápsula conectiva hialina, com predomínio colagenoso, redução do número de vasos neoformados e da celularidade.
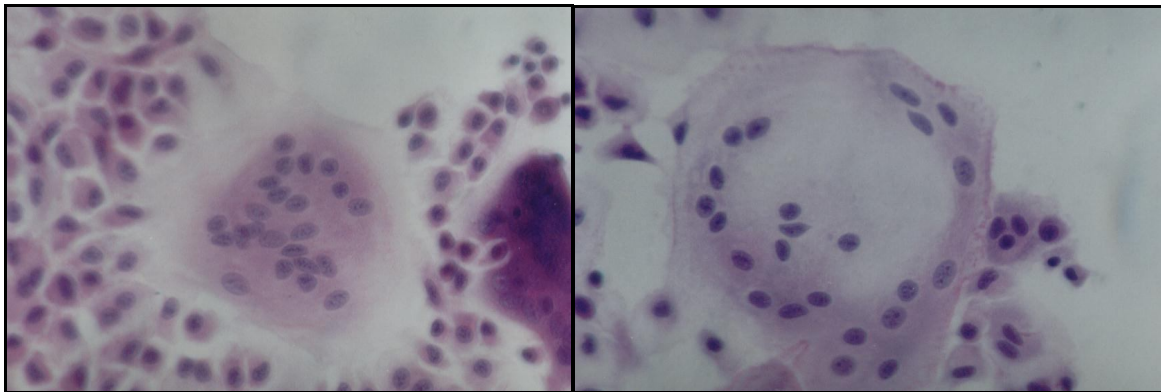
Figura 5. Macrófagos isolados, gigantócitos do tipo corpo estranho (esq.) com s núcleos distribuídos aleatoriamente pelo citoplasma e de Langhans (dir.) com núcleos na periferia do citoplasma formados em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo. HE x1000.

O processo cicatricial

A cura das feridas inicia-se precocemente com o processo inflamatório e, após diversos fenômenos, resulta na substituição das células mortas ou lesadas por células sadias.

O processo de cura envolve dois fenômenos básicos, quais sejam o da *regeneração*, em que as células lesadas são substituídas por outras do mesmo tipo e adjacentes, e o da *reparação*, em que a substituição do tecido perdido é feita por tecido conectivo, que irá constituir a cicatriz. Na maioria das lesões ambos os fenômenos ocorrem concomitantemente pela tentativa de restaurar, pelo menos em parte, a continuidade morfológica do órgão ou tecido afetado.

Quanto a sua capacidade de proliferação, as células do organismo são classificadas em lábeis, estáveis e permanentes.

As células lábeis proliferam-se continuamente para substituir suas semelhantes perdidas continuamente nos epitélios de revestimento e células sanguíneas. A perda de células epiteliais em consequência de lesões é quase que perfeitamente reconstituída pela multiplicação de células de reserva, quando em ferimentos superficiais. Lesões mais profundas como úlceras, em que a perda de substância é mais drástica, requerem o preenchimento das camadas mais profundas que foram perdidas por tecido conectivo. A medula óssea mantém a hematopoiese durante toda a vida e a destruição de células hematopoiéticas é compensada pela produção de novos elementos.

Apesar do baixo nível de replicação das *células estáveis*, vários estímulos podem produzir uma resposta rápida, com elevada taxa de mitose, para reconstituir a perda de substância de um órgão ou tecido, com células do mesmo tipo das que foram perdidas. Praticamente todas as células parenquimatosas de órgãos glandulares como o fígado, rins, pâncreas, e derivados mesenquimais e endoteliais vasculares são constituídos por células estáveis.

Apesar da capacidade de regeneração das células lábeis e estáveis, quando a perda tecidual é extensa, envolvendo o tecido estromal que dá sustentação ao parênquima, não ocorre a reconstituição da estrutura normal. Para que a substituição ocorra de forma adequada é necessária a presença do estroma para que as células parenquimatosas possam ter uma superfície de apoio, cujo principal componente é a membrana basal. Na sua perda, a proliferação celular ocorre de forma desordenada, produzindo massas de células morfologicamente diferentes do arranjo original.

As células do tecido conectivo como fibroblastos, condrócitos e osteócitos, que secretam matriz conectiva são quiescentes no mamífero adulto. Entretanto, quando o organismo sofre agressão, passam a se proliferar, particularmente os fibroblastos. A esse grupo pertencem também o endotélio vascular e o músculo liso. Quando ocorre destruição de um segmento do endotélio de grandes vasos por estímulos mecânicos ou químicos, as células endoteliais migram para o interior da lesão, sofrem multiplicação e preenchem o defeito. Os capilares, arteríolas e vênulas, quando danificados, formam brotos preenchendo a zona inflamada com uma rede de neovasos.

A musculatura lisa, sob influência de mediadores e/ou moduladores também sofre proliferação, como resposta à lesão na parede de grandes artérias.

O grupo das *células permanentes* inclui as células nervosas e da musculatura cardíaca e esquelética estriada, que não fazem mitose. Em lesões do sistema nervoso central ocorre proliferação de células gliais que são componentes do estroma. Nos nervos periféricos a situação é um pouco diferente. Quando o corpo neuronal é lesado, a estrutura inteira (neurônio e axônio) sofre degeneração. Entretanto, quando apenas o axônio é comprometido, outro é formado a partir do corpo neuronal ou do segmento proximal do próprio axônio perdido (para mais informações veja Majno & Joris, 1996; Cotran et al., 2004).

De acordo com Moraes et al. (2003) em feridas cutâneas provocadas experimentalmente é possível comprovar que o processo inflamatório é um fenômeno sequenciado, com vários eventos, até atingir a completa regeneração dos tecidos lesados, quais sejam re-epitelização, migração de

células inflamatórias, proliferação de fibroblastos, angiogênese, síntese de colágeno e remodelação dos tecidos.

Em peixes, esse processo acontece em duas etapas: a primeira, inicial e precoce que é a eliminação do tecido lesado e a re-epitelização da ferida; e a segunda, mais tardia, compreende a reorganização do tecido conectivo dérmico (Bereiter-Hahn et al., 1986). A evolução desse processo, todavia, ocorre de formas distintas nos diferentes gêneros de peixes. Assim, em *Cyprinus carpio*, a re-epitelização ocorre pela migração de células epiteliais, em blocos compactos, que se movem sem perder o contato celular (Iger et al., 1988), preservando intactas suas ligações desmossômicas, fagocitando debris celulares (Phromsuthirak, 1977) e demonstrando intensa atividade peroxidase no interior dos fagossomas (Iger & Abraham, 1990). Ao contrário, na pele de *Rita rita* as células epiteliais migram isoladamente até o local lesado, perdendo o contato de seus desmossomos (Mittal & Munshi, 1974).

De acordo com Bereiter-Hahn et al. (1986), o processo de re-epitelização em teleósteos ocorre em cinco estágios: a) preenchimento da cavidade por debris celulares e muco; b) destacamento da epiderme da lâmina basal, que ocorre poucos minutos após a injúria; c) migração das células epiteliais para a cavidade da ferida com perda do contato celular; d) migração convergente, vinda de diversas regiões, refazendo a continuidade celular; e) crescimento, diferenciação e remodelamento das células novas até alguns dias após a injúria.

Mittal & Munshi (1974) acompanharam a migração de células epiteliais em *R. rita.* Os autores fizeram referência à migração celular das bordas da ferida em direção ao centro recobrindo totalmente a lesão entre quatro e seis horas. Esse mesmo tempo de evolução, foi observado por Dutta & Ray (1994), em *Clarias batrachus*. Em salmão do atlântico *Salmo salar*, Anderson & Roberts (1975) descreveram o recobrimento da ferida após três horas, similarmente ao observado por Iger e Abraham (1990), em *C. carpio*. Por outro lado, Bullock et al. (1978 a, b) acompanhando a cicatrização de feridas em *Pleuronectes platessa*, mantidos em diferentes temperaturas, detectaram a completa cobertura epitelial em 12 horas, a 5ºC. Todos os autores supracitados induziram, nos peixes, ferida cirúrgica linear que variavam de 0,2 a 1,0 cm de comprimento com profundidades de 0,2 a 0,6 cm. Moraes et al. (2003), embora tenham usado feridas de maiores dimensões (2,0 x 1,0 cm, representando 3% da área total de pele do peixe) em que toda a pele foi retirada, os resultados foram semelhantes, ocorrendo em menos de 24 horas (Moraes et al. , 2003).

Durante os estudos de Mittal & Munshi (1974) e Quilhac & Sire, (1999), estes observaram que até a completa regeneração da lesão não acontecia meiose das células epiteliais e a cobertura da ferida se fazia pela expansão do mesmo tipo celular a partir da epiderme sadia, na área circunvizinha à lesão. Moraes et al. (2003) confirmaram tais observações, pois constataram diminuição da espessura da epiderme que circundava a área lesada e a sua expansão linear. A re-epitelização rápida é importante para que não aconteça desequilíbrio osmótico e/ou agressão por parte de patógenos oportunistas presentes no ambiente (Bullock et al., 1978 a, b; Jauncey et al., 1985).

Nos peixes é grande o número de células mucosas presentes na epiderme e sua quantidade pode variar em função da espécie ou do local. Durante o processo cicatricial o número dessas células aumenta

progressivamente (Moraes et al., 2003). As células mucosas são produtoras de muco que é rico em anticorpos, lisozima e ácidos graxos de baixo peso molecular, com atividade antimicrobiana (Noga, 1996).

Macroscopicamente as áreas lesadas não tiveram sua forma e tamanho modificado até o décimo quarto dia, observando-se congestão acentuada e o recobrimento por uma substância de cor branca, de aspecto fibrinoso (Moraes et al., 2003). Essa coloração esbranquiçada foi atribuída às novas células epidermais que se desenvolveram. Nesse estágio observa-se a presença de tecido conectivo frouxo edemaciado, logo abaixo da epiderme e áreas difusas de hemorragia e fibrina em grande quantidade, logo abaixo da linha da epiderme em regeneração (Anderson & Roberts, 1975; Iger & Abraham, 1990; Dutta & Rai, 1994). A camada de fibrina atua como substrato para a migração e deposição epitelial (Dutta & Rai, 1994). Em *O. niloticus*, logo após a indução da lesão, o epitélio em volta da ferida torna-se esponjoso, as células de Malpighi migram para o foco lesado e produzem uma camada de fibrina que recobre as miofibrilas (Jauncey et al., 1985).

Na derme de peixes, o processo de reparo tem início com a ruptura dos capilares, ocorrendo os eventos da cascata de coagulação, como o aumento da permeabilidade vascular e migração de células inflamatórias até a região central e avascular da ferida. O processo continua com a proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno e matriz extracelular e de células endoteliais.

Na primeira hora após a injúria, diferentes tipos de leucócitos migram para o foco inflamatório. Os macrófagos são os principais responsáveis pelo debridamento da ferida e chegam ao foco uma hora após a injúria e seu número volta novamente a aumentar após 48 horas (Iger & Abraham, 1990). A atividade fagocitária também foi descrita para eosinófilos (Ellis, 1977; Suzuki, 1986) e para basófilos (Iger & Abraham, 1990). Moraes et al. (2003) induziram feridas de maiores dimensões em pacus e observaram o surgimento de células inflamatórias a partir do terceiro dia, atingindo o máximo no sétimo dia. Essas células apresentam-se dispostas em forma de focos ou de modo difuso por toda a área dermal. Nestes infiltrados inflamatórios predominavam inicialmente polimorfonucleares e mais tarde os macrófagos, que foram os dois tipos celulares predominantes na lesão.

A angiogênese é máxima no sétimo dia, permanecendo intensa até o décimo quarto dia, para então regredir (Moraes et al., 2003). A proliferação fibroblástica começou a ser observada no sétimo dia, estando presentes também fibras colágenas dispostas desorganizadamente ou desalinhadas. Aos quatorze dias, elas se mostraram em quantidade maior e mais organizadas ou alinhadas (Moraes et al., 2003).

Gradativamente, a área ao redor da ferida vai se tornando escura pela deposição de melanina, cujos grânulos aparecem livres ou no interior de macrófagos, quando observados à microscopia de luz. A melanina tem propriedade bactericida (Ellis, 1977) e os melanócitos podem desempenhar papel preventivo às infecções bacterianas após a injúria (Moraes et al., 2003; Iwashita et al., 2009).

Como último evento, no processo de regeneração dos tecidos, constatou-se a formação das escamas processando-se da periferia para o centro da lesão.

Modelos experimentais de estudo de inflamação e cicatrização

A - Inflamação aguda

Matushima & Mariano (1996) desenvolveram o modelo de estudo da inflamação aguda na bexiga natatória. Em peixes, esse processo é tradicionalmente estudado na cavidade celomática que apresenta certas desvantagens como o grande conteúdo de vísceras do trato digestivo e gênito-urinário, que podem sofrer perfurações no momento de injeções e inoculações, assim como há dificuldades de colheita de exsudato. A bexiga natatória oferece vantagens visto que é um órgão cavitário, bem delimitado, de circulação terminal, fácil acesso para inoculações e colheita de exsudato. Qualquer que seja o agente flogógeno e seu veículo, a injeção ou inoculação deve ser aplicada, após anestesia, na região anteromediana, um centímetro à direita do final do opérculo, à altura da linha lateral, com auxílio de agulha e seringa de tuberculina esterilizada, de modo a atingir a bexiga natatória anterior.

Dentre os agentes utilizados como estímulo inflamatório, a carragenina, um polissacarídeo sulfatado extraído do musgo irlandês, é um dos mais utilizados, particularmente quando a avaliação de drogas anti-inflamatórias é um dos objetivos. A importância desse agente flogógeno está no fato de provocar inflamação aguda multimediada, envolvendo vários mediadores químicos, ao contrário de quando se usa somente suas frações ou agentes mais específicos. Quando o processo induzido pela carragenina sofre cronificação, ocorre o acúmulo de macrófagos, que tem vida média longa, sem se transformar em outros tipos celulares como o epitelioide e o policarionte.

Para avaliação do componente celular inflamatório 6, 24 e 48 horas depois da aplicação do estímulo inflamatório, os peixes devem ser sacrificados com solução de benzocaína, por aprofundamento do plano anestésico, até perderem completamente os movimentos operculares. Em seguida, dissecados por um corte longitudinal ventral, do ânus ao opérculo; outro do ânus até a cabeça seguindo a linha lateral e um terceiro passando pela nadadeira peitoral. Essa dissecação permitiu ampla visão de todos os órgãos. A seguir o interior da bexiga natatória deve ser lavado com a injeção de 0,5 mL de solução de PBS contendo 0,01 ml de EDTA a 5%. O mesmo volume injetado deve ser recolhido com pipeta Pasteur e transferido para tubos de centrífuga mantidos no gelo. Uma alíquota desse volume deve ser transferida para câmara de Newbauer para contagem das células inflamatórias totais em microscopia de luz. Para a contagem diferencial de trombócitos, linfócitos, macrófagos e granulócitos, centrifuga-se o exsudato a 1000 rpm, por cinco minutos, em centrífuga clínica. O sedimento total deve ser retirado com pipeta Pasteur e colocado sobre lâmina histológica com uma gota de soro da mesma espécie de peixe colhido no dia anterior. Após homogeneização foi feita a extensão do exsudato. Deixou-se a lâmina secar em temperatura ambiente para posterior fixação em álcool metílico por um minuto. Depois de secas foram coradas pancromicamente com corante May-Grunwald-Giemsa-Wrigth (Tavares-Dias & Moraes, 2003) para posterior contagem em microscopia de luz.

De acordo com os estudos de Bozzo (2007), quatro horas após a inoculação de *A. hydrophila* inativada, ou tioglicolato, na bexiga natatória, observa-se discreta hipertrofia das fibras do tecido conectivo e congestão em capilares da submucosa, edema e infiltração de células inflamatórias mononucleares (Figura 6). Na 24ª hora após a inoculação de *A. hydrophila* inativada e/ou tioglicolato constatou-se congestão moderada, edema, hemorragia, acentuado acúmulo de células, predominantemente mononucleares. Na túnica interna observou-se moderada hipertrofia de fibras de tecido conectivo da submucosa, particularmente nos grupos inoculados com *A. hydrophila*. Ocorreu diminuição do infiltrado inflamatório na 48ª, com hipertrofia de tecido conectivo da submucosa, discreta congestão de capilares e edema da submucosa. Essas lesões que ocorreram na bexiga natatória foram semelhantes nos grupos de peixes inoculados com *A. hydrophila* inativada ou tioglicolato. A injeção de salina na bexiga natatória induziu alterações semelhantes com menor intensidade.

B - A inflamação crônica por corpo estranho

O implante da lamínula obedece a técnica desenvolvida por Petric et al. (2003) para estudos da inflamação por corpo estranho em peixes. Com os peixes anestesiados e auxílio de bisturi deve ser realizada uma pequena incisão na região latero-dorsal esquerda, atrás do opérculo esquerdo na altura do início da nadadeira dorsal. O tecido subcutâneo deve ser divulsionado com tesoura cirúrgica e a seguir, a lamínula esterilizada por flambagem em bico de Bulsen, introduzida entre a pele e tecido muscular subjacente. A seguir, a pele deve ser suturada com pontos simples usando-se fio de náilon previamente esterilizado (Figuras 7-8). Após o manuseio, os animais devem ser recolocados nos aquários de origem, com fluxo contínuo de água e aeração suplementar. Para a prevenção de infecções, deve ser feito banho de NaCl (10g/L), durante 15 minutos, repetindo este procedimento nos dois dias seguintes com 1g de sal/L).
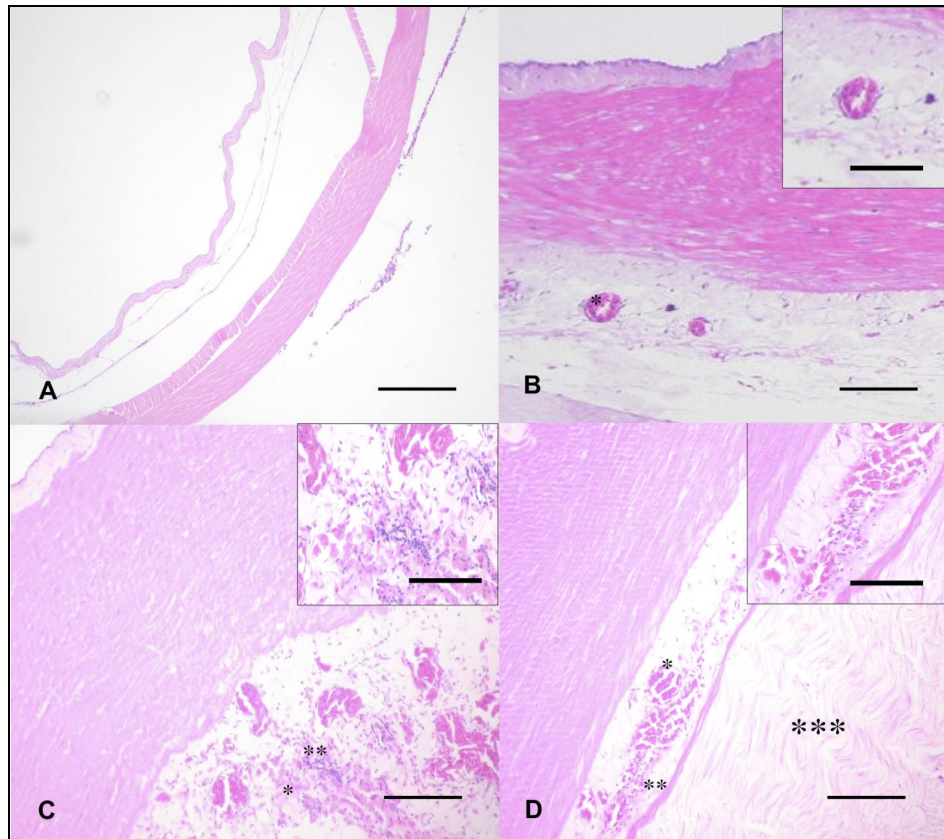
Figura 6. Lesões inflamatórias da bexiga natatória de *P. mesopotamicus* **(A)** sem alterações. (**B**) congestão vascular quatro horas após inoculação de *A. hydrophila*, (∗). **(C)** edema 24 horas pós-inoculação de *A. hydrophila* (∗), infiltrado mononuclear (∗∗). **(D)** 48 horas após injeção de tioglicolato, congestão de vascular (∗), infiltrado mononuclear (∗∗), dissociação de fibras do tecido conectivo (∗∗∗). Barra: 25μm (foto maior), Barra: 12,5μm (foto menor) (HE). Bozzo et al. (2007).
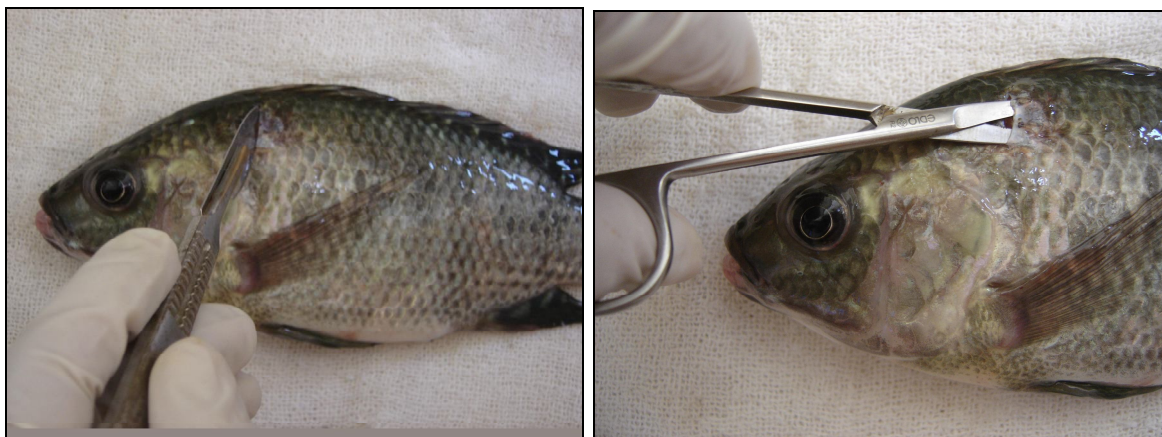
Figura 7. Incisão dorso lateral esquerda da tilápia e divulsionamento do tecido do subcutâneo.

Figura 8. Implante da lamínula seguida de sutura da ferida cirúrgica.

Para a retirada das lamínulas implantadas, os peixes devem ser sacrificados em diferentes tempos após o implante previamente determinados (dois, quatro, seis e oito dias). Após a abertura do ponto cirúrgico, as lamínulas devem ser cuidadosamente retiradas com o auxílio de pinça, lavadas com solução salina 0,65% para retirada de fibrina e outras células não aderentes à lamínula. A seguir fixar em solução de Bouin por cerca de um minuto e corar com hematoxilina-eosina.

As contagens podem ser realizadas em aumento de 40x, em auxílio de contador manual ou analisador de imagens. Estabelecer a média de contagem de dez campos por lamínula escolhidos aleatoriamente. Cada célula gigante deve ser contada quando, no mínimo 50% de sua extensão, estiverem no interior do campo de contagem. Para tal avaliação as células devem ser classificadas de acordo com o número de núcleos, escolhidas ao acaso com o microscópio desfocado e também quanto a sua morfologia conforme o esquema abaixo:

1) número de macrófagos com um núcleo;
2) número de células gigantes com: 2 a 3 núcleos, 4 a 5 núcleos, 10 a 11 núcleos e 31 a 40 núcleos.
3) relação entre o número de células de Langhans e do tipo corpo estranho, independentemente do tratamento.

C - O processo cicatricial

O estudo da cinética do processo cicatricial também é possível experimentalmente. Moraes et al. (2003) utilizaram o pacu para estudar a cinética da cicatrização de feridas cutâneas. Para padronizar a extensão das lesões cutâneas, foi feito um molde em lâmina de polietileno, medindo 15 mm de comprimento por 10 mm de largura, que foi usado para delimitar a área de pele a ser removida, constituída por epiderme e derme. As feridas de todos os

peixes foram produzidas, no mesmo dia, na região latero-dorsal direita, logo abaixo da nadadeira dorsal e acima da linha média lateral. O fragmento de pele demarcado pelo molde foi retirado, sendo que as feridas retangulares (15 mm x 10 mm x 0,25 mm) apresentavam área aproximada de dois centímetros quadrados, representando aproximadamente 3% da superfície corporal.

Em tempos pré-determinados, após sacrifício dos animais por aprofundamento do plano anestésico, a área da lesão deve ser avaliada com auxílio de sistema analisador de imagens (Videoplan, KS100) ou outro método disponível, como a planimetria, por exemplo, e calculado o índice percentual de retração da ferida segundo a equação:

$$IR = \frac{ai - af}{af} \times 100$$

Onde: IR = índice de retração; ai = área inicial; af = área final.

A avaliação das feridas pode ser realizada depois de 1, 3,7, 14, 21, 28 e 35 dias após a injúria. A seguir, retira-se um fragmento de pele que inclua parte da ferida, camada muscular e bordos adjacentes. O fragmento após ser fixado em solução de formalina tamponada a 10%, será processado segundo os métodos usuais em histologia para inclusão em parafina e obtenção de cortes de cinco micrômetros de espessura. Estes devem ser corados com hematoxilina-eosina, azul de toluidina, tricrômio de Masson e reação com o ácido periódico de Schiff (PAS). O uso de corantes como o “Sirius red” para caracterizar os tipos de colágeno também é interessante. As secções devem ser examinadas em microscopia de luz comum e microscopia de luz polarizada para observação da refringência das fibras colágenas.

Após a descrição morfológica ser realizada, a morfometria deve ser determinada em cinco campos microscópicos de cada corte, escolhidos ao acaso com o microscópio desfocado. As lesões devem ser avaliadas quanto à hiperplasia epitelial, presença e número de células mucosas, células inflamatórias e neovasos, em cada tempo, para cada grupo. As contagens podem ser realizadas em microscópio com ocular integradora Reichert PK 6,3 x nn (Áustria) ou em sistema analisador de imagens.

Imunoestimulantes

Ações que promovam a piscicultura em seus aspectos produtivos e de bem-estar são desejáveis. Atualmente, grandes investimentos são canalizados para pesquisas que tenham como objetivo viabilizar aspectos nutricionais que atendam necessidades fisiológicas de crescimento, manutenção, reprodução e sanidade dos peixes, genericamente denominada de nutracêutica.

Nos últimos anos, a literatura demonstra que alguns grupos de compostos podem ser utilizados como suplementos na alimentação de peixes para favorecer respostas de defesa. Tais substâncias foram agrupadas como imunoestimulantes e incluem combinações vitamínicas, traços minerais e derivados de vegetais ou micro-organismos efetivos na prevenção de doenças

(Sakai, 1999). Essas substâncias podem ser ministradas aos peixes e sua eficiência testada em modelos experimentais adequados para tal fim, pela a avaliação de mecanismos de defesa como as variáveis inflamatórias ou mesmo por meio de desafio com patógenos (Siwicki et al., 1994).

Dentre tais substâncias se destacam as vitaminas C e E, o cromo trivalente, as leveduras como o *Saccharomyces cerevisiae* e os ácidos graxos essenciais Ω3 e Ω6. Nos últimos anos o Grupo de Extensão e Pesquisa em Ictiopatologia da Universidade Estadual Paulista, Unesp-Jaboticabal, SP, realizou vários ensaios com essas substâncias em situações experimentais envolvendo a inflamação aguda e crônica induzida por agentes antigênicos e não antigênicos (material inerte), desafio bacteriano e o processo cicatricial. A seguir, serão expostos os resultados obtidos e discutidos brevemente.

A vitamina C

A - Suplementação alimentar com vitamina C incrementa a resposta inflamatória crônica induzida por corpo estranho em pacus

A maioria das espécies de peixes não sintetiza vitamina C ou ácido ascórbico, devido à ausência de gulonolactona oxidase, dependendo de fontes externas para suas necessidades metabólicas (Chatterrjee et al., 1975; Albrektsen et al., 1988). O ácido ascórbico contribui para a formação do tecido cartilaginoso, ósseo e quando há a sua deficiência ocorrem deformações do esqueleto, anorexia e aumento dos efeitos nocivos do estresse (Halver, 1995). A síntese de colágeno e a atividade de fibroblastos são dependentes de vitamina C (Mitoma & Smith, 1960).

O ácido ascórbico age como antioxidante, pois o oxigênio reage com os radicais ascorbil da molécula de vitamina. Devido à presença de diversas hidroxilas na molécula é possível adicionar cadeias de hidrocarbonos e assim se inserir nas membranas celulares agindo como antioxidante natural (Loonstrom et al., 2000; Menezes et al., 2006).

A suplementação com vitamina C em dietas para organismos aquáticos diminui efeitos negativos do estresse e incrementa a resposta imunológica (Gill, 1991; Menezes et al., 2006; Andrade et al., 2007). Além disso, aumenta a tolerância dos peixes ao estresse por alta densidade de estocagem e ao manejo zootécnico (Mazik et al., 1987; Brum, 2003).

Salmonídeos alimentados com ração suplementada com vitamina C apresentam aumento da produção de anticorpos e a mantém por até 17 semanas contra *Ichthyophthirius multifiliis* (Wahli et al., 1986), *Vibrio salmonicida* (Navarre & Halver, 1989) e *Yersinia ruckeri*, havendo neste último caso aumento da taxa de fagocitose (Verlhac et al., 1993).

Em bagres *I. punctatus* infectados com *Edwardsiella ictaluri*, tem mortalidade nula quando a dieta está suplementada com 3.000 a 4.000 mg de vitamina C/kg de ração, devido ao aumento da produção de anticorpos e da atividade do sistema complemento (Li & Lovell, 1985). Esse resultado não se repetiu posteriormente (Li et al., 1993).

Pacus *P. mesopotamicus* alimentados com dietas suplementadas com vitamina C apresentam diminuição dos efeitos negativos do estresse e a infestação por Monogenoidea *Anacanthorus penilabiatus* (Martins, 1998). Em pirarucu *Arapaima gigas*, altas doses de vitamina contribuem para a síntese

de proteínas plasmática e melhoria da capacidade respiratória e imunológica dos animais (Menezes et al., 2006) e na redução do estresse (Andrade et al., 2007).

Ensaios foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito da vitamina C sobre a resposta inflamatória crônica por corpo estranho em pacus *P. mesopotamicus* induzida pelo implante de lamínula de vidro no tecido subcutâneo. Pacus foram então alimentados com ração suplementada com diferentes níveis de ascorbil polifosfato (não suplementados com 100 mg/kg; 200 mg/kg; 500 mg/kg) com 35% de atividade, durante 90 dias. Os peixes receberam os implantes que foram avaliados após 3, 7 e 14 dias. Verificou-se que, particularmente nos peixes que receberam suplementação de 500 mg/kg, ocorreu incremento significativo ($p<0,05$) do acúmulo de macrófagos isolados e da formação de policariontes tipo corpo estranho e tipo Langhans e do número de núcleos por célula (Petric et al., 2003b). A contagem de células gigantes, independentemente de tratar-se do tipo corpo estranho ou de Langhans e do número de núcleos por célula, foi significativamente maior ($p<0,01$) nos peixes tratados com 100 e 500 mg de vitamina C/kg de ração sete dias após o implante. Os animais tratados com 200 mg de vitamina C/kg de ração não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, não tratado, após sete dias. Aos 14 dias depois do implante, ocorreu inversão desses valores e maior número de células gigantes foi observado no grupo controle e no tratado com 100 mg de vitamina C/kg de ração, enquanto o menor número foi observado no tratamento de 200 e 500 mg de vitamina C/kg de ração. Tendo em mente que o maior número de células gigantes significa que são células menores, com menor número de núcleos, os tratamentos com 200 e 500 mg de vitamina C/kg de ração podem, neste momento, ter apresentado células gigantes com maior número de núcleos, tornando-se consequentemente maiores, diminuindo assim o número de células gigantes por área de contagem que é limitada (10 campos em aumento 400x). Esse fato aponta no sentido de que as maiores concentrações de vitamina C favoreceram maior recrutamento de macrófagos, promovendo o aumento do número de núcleos e do tamanho dos gigantócitos, em tempo relativamente mais curto que o observado nos outros grupos (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios e erros padrões (Epm) obtidos nas contagens de células gigantes, tipo corpo estranho e Langhans, depois de 3, 7 e 14 dias do implante da lamínula em peixes tratados com diferentes concentrações de vitamina C.

Tempo	0 mg vit C/kg		100 mg vit C/kg		200 mg vit C/kg		500 mg vit C/kg	
(dias)	Médias	Epm	Médias	Epm	Médias	Epm	Médias	Em
3	0,72aC	0,01	0,7aB	0,02	0,72 aC	0,02	0,73aC	0,01
7	1,98bB	0,19	2,74aA	0,14	2,13 bA	0,22	2,25aA	0,10
14	2,54aA	0,10	2,64aA	0,19	1,94bB	0,11	2,00bB	0,19

Médias seguidas por letras idênticas nas colunas (maiúsculas) e nas linhas (minúsculas) não diferem entre si pela análise fatorial 3x4 com transformação em arc.sen $\sqrt{x} + 0,5$. ($p<0,01$).

Na avaliação do número de células gigantes com 10 ou 11 núcleos, os animais tratados com 500 mg de vitamina C/kg de ração apresentaram, aos sete dias, maior número de células desta categoria do que os outros tratamentos (Tabela 5). Quatorze dias após o implante ocorre inversão neste parâmetro, indicando que nesta fase o tratamento com 500 mg de vitamina C/kg de ração é o que possui o menor número destas células (10 ou 11 núcleos). Mais uma vez segue-se o raciocínio de que este tratamento (500 mg de vitamina C/kg de ração) possivelmente acelerou a formação de gigantócitos perfazendo maior número de núcleos ao longo do tempo. Isso provocou diminuição do número de gigantócitos após quatorze dias. Esse resultado sugere que nesta fase, as células gigantes com 10 ou 11 núcleos já haviam evoluído para células gigantes com maior número de núcleos.

Tabela 5. Valores médios e respectivos erros padrões (Epm) obtidos nas contagens de células gigantes com 10 ou 11 núcleos, depois de 3, 7 e 14 dias do implante da lamínula em peixes tratados com diferentes concentrações de vitamina C.

Tempo	0 mg vit C/kg		100 mg vit C/kg		200 mg vit C/kg		500 mg vit C/kg	
(dias)	Médias	Epm	Médias	Epm	Médias	Epm	Médias	Epm
3	0,71aA	0	0,71aB	0	0,71 aC	0	0,71aB	0
7	0,74bA	0,02	0,76 bAB	0,02	0,76 bB	0,02	0,86aA	0,04
4	0,77A	0,02	0,83aA	0,03	0,86 aA	0,03	0,76aB	0,03

Médias seguidas por letras idênticas nas colunas (maiúsculas) e nas linhas (minúsculas) não diferem entre si pela análise fatorial 3x4 com transformação em arc.sen $\sqrt{x} + 0,5$. ($p<0,01$).

Na literatura que foi possível compulsar não se encontrou informação sobre a suplementação alimentar com vitamina C, empregando o modelo do implante da lamínula de vidro, demonstrando o caráter inédito destas observações aqui descritas em peixes. Nossos resultados apontam no sentido de que as maiores concentrações (200 e 500 mg de vitamina C/kg de ração) de vitamina C potenciam e aceleram o acúmulo de macrófagos, promovendo o aumento do número de núcleos e do tamanho dos gigantócitos, em tempo relativamente mais curto que o observado no grupo controle ou no grupo suplementado com 100 mg de vitamina C/kg de ração. Esse efeito pode resultar da ação antioxidante da vitamina ou por ter alguma característica antiestressante que contribuiria para maior efetividade da resposta (para detalhes veja Petric et al., 2003a, b).

B - Suplementação alimentar com vitamina C na inflamação crônica por corpo estranho em pacus mantidos em duas densidades de estocagem

Em novo ensaio realizado por Brum (2003) utilizando-se do mesmo modelo experimental, os pacus foram mantidos em duas densidades de estocagem (5kg/m^3 e 20kg/m^3) e a ração suplementada ou não com 500 mg ascorbil-polifosfato (AP) /kg com 35% de atividade. Os resultados demonstraram que peixes que receberam dieta suplementada e foram mantidos em 5Kg/m^3 apresentaram maiores acúmulos de macrófagos e formação de células gigantes. Esta resposta foi parcialmente inibida quando peixes que não receberam dieta suplementada foram mantidos na densidade de 20Kg/m^3. Nessa densidade, quando alimentados com a dieta contendo a vitamina C, a resposta foi semelhante à observada no grupo controle (Tabelas 6-8).

Os suplementados na densidade de 20kg/m^3 apresentaram menor concentração de cortisol plasmático se comparado ao grupo mantido na mesma densidade não suplementado (Tabela 9). Não houve diferença entre os grupos quanto à glicemia que se manteve em níveis basais.

Tabela 6. Número médio e desvio padrão de macrófagos isolados em lamínulas implantadas no tecido subcutâneo de pacus *P. mesopotamicus* não suplementados (Sem vit. C) e suplementados com 500 mg vitamina C/kg (Com vit. C) na ração, mantidos em 5 kg/m^3 ou 20 kg/m^3, avaliadas 3, 6 e 12 dias depois.

	Dias	3	6	12
Sem vit. C	5 kg/m^3	7,9 ± 14,258Aa	1860,6 ±799,89Bb	2582,4±300,57Bb
	20 kg/m^3	10,3 ± 7,22Aa	3349± 768,74Bb	1467,1±427,39Cb
Com vit. C	5 kg/m^3	276,4±53,74Ab	1605,7±145,56Bb	3295,6±605,67Ca
	20 kg/m^3	0 Ba	603±232,3Ba	3097,3±513,67Aa

Letras maiúsculas referem-se aos diferentes períodos de avaliação; minúsculas à relação entre os tratamentos dentro de cada momento de avaliação; teste de Tukey ($p<0,05$).

Tabela 7. Valores médios e desvio padrão do número de gigantócitos com 2 a 5 e 6 a 10 núcleos em lamínulas implantadas no tecido subcutâneo em pacus *P. mesopotamicus* com dieta não suplementada ou suplementada com 500 mg vitamina C/kg, mantidos em 5 kg/m^3 ou 20 kg/m^3 e avaliadas três, seis e doze dias depois.

		Dois a cinco núcleos		
	Dias	3	6	12
Sem vit. C	5 kg/m^3	0,1±0,13Ba	120,7±64,12Ba	391,9±76,39Ab
	20 g/m^3	0,7±0,43Aa	178,9±2,05Ba	277,3±121,86Bb
Com vit. C	5 kg/m^3	9,6±3,28Ba	163,3±56,55Ba	948,7±133,95Aa
	20 kg/m^3	0,0Aa	22,9± 14,64Aa	162,3 ± 27,46Ab
		Seis a 10 núcleos		
	dias	3	6	12
Sem vit. C	5 kg/m3	0,0Aa	4,4±2,32Ba	4,0±1,95Ba
	20 kg/m3	0,0Aa	8,1±2,05Bb	18,6±11,34Bb
Com vit. C	5 kg/m3	0,6±0,34Ba	1,6±0,94Ba	13,0±3,09Ab
	20 kg/m3	0,0Ba	1,4±0,27Ba	10,6±3,23Ab

As letras maiúsculas referem-se à análise dos tratamentos entre os diferentes períodos de avaliação; minúsculas referem-se à relação entre os tratamentos dentro de cada momento de avaliação. Teste de Tukey, $p<0,05$.

Tabela 8. Valores médios e erro padrão do número de células de Langhans, independentemente do número de núcleos, em lamínulas implantadas no tecido subcutâneo de pacus *P. mesopotamicus* não suplementados e suplementados com 500 mg vitamina C/kg de ração, mantidos em 5 kg/m^3 ou 20 kg/m^3 e avaliadas 3, 6 e 12 dias depois.

Dias		3	6	12
Sem vitamina C	5 kg/m^3	0,0Aa	0,0Aa	3,4 ±1,83Ba
	20 kg/m^3	0,0Aa	0,0Aa	1,9 ± 1,28Ab
Com vitamina C	5 kg/m^3	0,0Aa	0,0Aa	7,9 ±1,74Ba
	20 kg/m^3	0,0Aa	0,0Aa	0,7 ± 0,66Ab

As letras maiúsculas referem-se à análise dos tratamentos entre os diferentes períodos de avaliação e as minúsculas referem-se à relação entre os tratamentos dentro de cada momento de avaliação ($p<0,05$).

Tabela 9. Valores médios e erro padrão dos teores de cortisol plasmático de pacus *Piaractus mesopotamicus* não suplementados e suplementados com 500 mg vitamina C/kg de ração, mantidos em 5 kg/m^3 ou 20 kg/m^3, avaliados três, seis e doze dias depois

Dias		3	6	12
Sem vit. C	5 kg/m^3	9,32±0662 Aa	7,30±0,922Aa	6,20±0,948Aa
	20 kg/m^3	9,12±0,585Aa	5,80±,580Ba	10,74±,854Ab
Com vit. C	5 kg/m^3	6,72±0,604Aa	8,96±0,635Aa	6,59±1,146Aa
	20 kg/m^3	8,39±1,062Aa	7,73±0,693Aa	6,49±0,399Aa

As letras maiúsculas referem-se à análise dos tratamentos entre os diferentes dias de avaliação; minúsculas referem-se à relação entre os tratamentos dentro de cada momento de avaliação. Teste de Tukey ($p<0,05$).

Nos peixes suplementados mantidos na densidade de 5 kg/m^3, ocorreu maior formação de células de Langhans, em relação aos mantidos em 20 kg/m^3 e suplementados. É possível que a suplementação tenha contribuído, pelo menos em parte, para o incremento da resposta dos macrófagos como consequência dos níveis circulantes mais baixos de cortisol. No grupo suplementado mantido em 5 kg/m^3, houve maior acúmulo de macrófagos policariontes em menor tempo, corroborando os resultados de Petric et al. (2003b).

O controle do desenvolvimento da reação inflamatória em ratos está intimamente relacionado às ações farmacológicas de corticosteroides endógenos (Moraes & Garcia-Leme, 1982), pelo bloqueio da atividade da fosfolipase A2, inibindo a síntese de eicosanoides e do fator ativador de plaquetas (Flower, 1986), a liberação de interleucina-1 (Dinarello, 1984) e a adesão de leucócitos ao endotélio vascular inibindo sua migração (Flower, 1986). Os resultados deste ensaio sugerem que nos peixes mantidos na densidade mais elevada e não suplementados, esse fenômeno aconteceu, graças às relações entre níveis mais altos de cortisol com menor formação de gigantócitos. Nos peixes suplementados mantidos na densidade de 20 kg/m^3 a concentração plasmática de cortisol foi menor, favorecendo, pelo menos em parte, o acúmulo de macrófagos na lamínula.

Os resultados obtidos sugerem benefícios da suplementação alimentar com ascorbil polifosfato sobre a atividade de macrófagos, pois favoreceu o seu acúmulo na lamínula e a formação do macrófagos policariontes, no modelo experimental empregado. Além de atuar como antioxidante, preservando as membranas de leucócitos, a suplementação diminuiu a liberação de cortisol em peixes mantidos na densidade de 20 kg/m3, indicando efeito antiestressante. Acrescente-se que o bom nível de atividade do sistema complemento e da lisozima estão correlacionadas com a concentração de vitamina C nos tecidos (Chen et al., 2004). Assim o ascorbil polifosfato pode ser indicado na concentração de 450 mg/kg para uso

estratégico como agente profilático, reduzindo os efeitos nocivos do estresse de manejo na piscicultura (Brum, 2003).

C - Suplementação alimentar com vitamina C favorece o fenômeno cicatricial

O processo de cicatrização em peixes consiste na eliminação do tecido lesado, re-epitelização da ferida e reorganização do tecido conectivo dérmico (Bereiter-Hahn et al., 1986). O processo de re-epitelização em teleósteos ocorre, inicialmente, pelo preenchimento da cavidade por debris celulares e muco, segue-se a migração das células epiteliais com perda do contato celular. A migração convergente oriunda de diferentes direções refaz a continuidade epitelial e ocorre o crescimento, a diferenciação e o remodelamento da massa de células (Bereiter-Hahn et al., 1986).

Na derme o processo de reparo inicia-se com a ruptura dos capilares desencadeando a hemostasia; segue-se o aumento da permeabilidade vascular e a migração de células inflamatórias até a região central avascular da ferida. Sobrevém a proliferação de fibroblastos que sintetizam colágeno e matriz extracelular e a multiplicação de células endoteliais. Os granulócitos chegam ao sítio lesado e, mais tardiamente, os mononucleares. A função dos neutrófilos é a fagocitose de debris celulares, corpos estranhos e micro-organismos, e os macrófagos são responsáveis pelo debridamento (Iger & Abraham, 1990).

A síntese de colágeno é dependente da atividade de fibroblastos e a vitamina C tem papel importante na maturação destas células (Mitoma & Smith, 1960). Além disso, a vitamina C favorece o acúmulo de macrófagos e a formação de gigantócitos policariontes em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de pacus (Petric et al., 2003b; Brum, 2003). Esses fatos indicam que o ácido ascórbico contribui para maior eficiência dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

Moraes et al. (2003) estudaram comparativamente a evolução do processo cicatricial em lesões cutâneas induzidas cirurgicamente em pacus *P. mesopotamicus*, jovens, alimentados com ração suplementada com 100, 200 e 500 mg/kg de ácido ascórbico estabelecendo-se a caracterização morfológica e a avaliação morfométrica nas diferentes fases. As feridas foram produzidas em forma retangular (15 mm x 10 mm x 0,25 mm), com área aproximada de dois centímetros quadrados, correspondendo a três por cento da área total da superfície corporal. A avaliação das feridas foi realizada depois de 1, 3, 7, 14 e 21, 28 e 35 dias da injúria, em seis peixes de cada grupo.

Macroscopicamente as áreas lesadas não tiveram sua forma e tamanho modificados até o décimo quarto dia. Porém, aos trinta e cinco dias, as dimensões da ferida apresentaram relação entre a concentração de vitamina presente na ração e a redução da área lesada. A formação das escamas acompanhou a evolução de todo o processo, demonstrando relação direta entre o tamanho da área ocupada pelas escamas formadas e a quantidade de vitamina C na ração. A comparação entre os grupos evidencia esse fato, pois a área recoberta por escamas aumentou de acordo com a concentração de ácido ascórbico na ração (Figura 9).
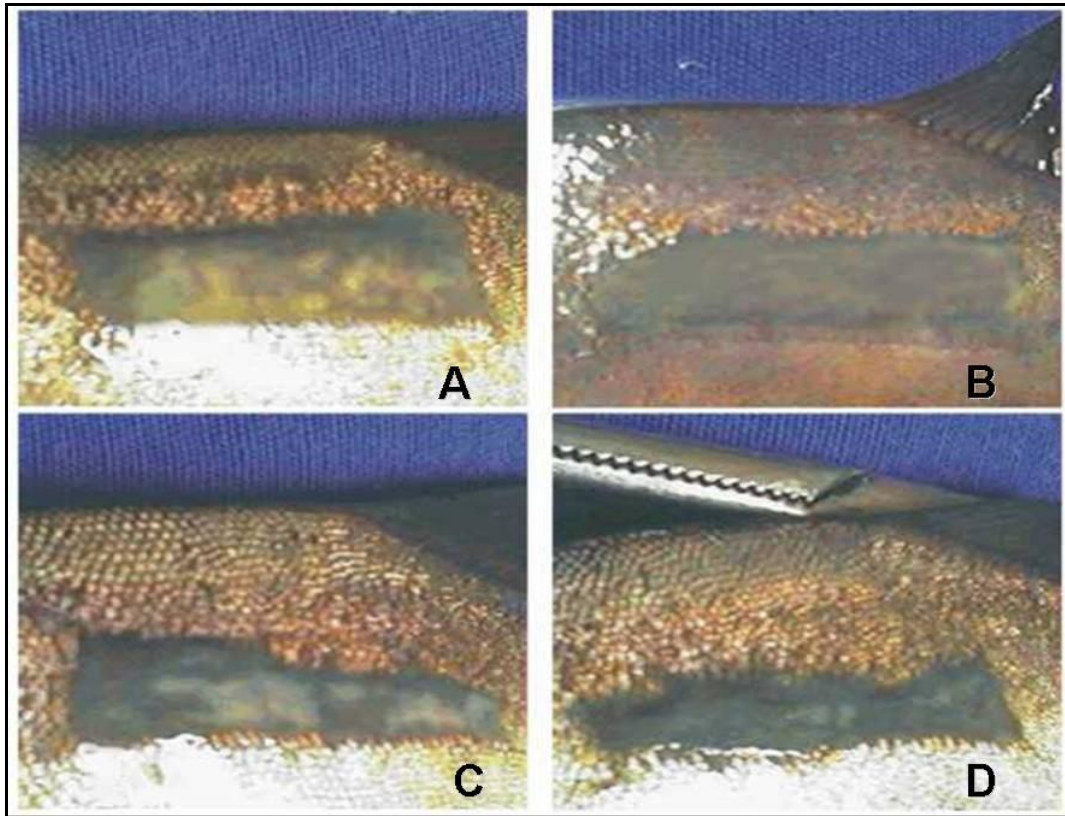
Figura 9. Aspecto macroscópico das feridas trinta e cinco dias após a indução. (**A)** grupo controle; (**B**) grupo tratado com 100 mg de vitamina/kg de ração; (**C**) grupo tratado com 200 mg de vitamina/kg de ração; (**D**) grupo tratado com 500 mg de vitamina/kg. Observar a proporcionalidade entre a concentração de vitamina oferecida e redução da área (setas) da ferida. Moraes et al. (2003).

Microscopicamente notou-se tecido conectivo frouxo edemaciado, malhas de fibrina e hemorragia. O edema verificado foi consequência do aumento de permeabilidade vascular, característico da fase aguda da inflamação, que tem por função diluir toxinas ou agentes agressores. A presença de fibrina abaixo da epiderme em regeneração sugere que tenha a função de substrato de apoio para a migração e deposição de células epiteliais e/ou inflamatórias que têm participação ativa no fenômeno de cicatrização (Figura 10). Esses achados são semelhantes ao descrito por outros autores (Anderson & Roberts, 1975; Jauncey et al., 1985; Iger & Abraham, 1990; Dutta & Rai, 1994).
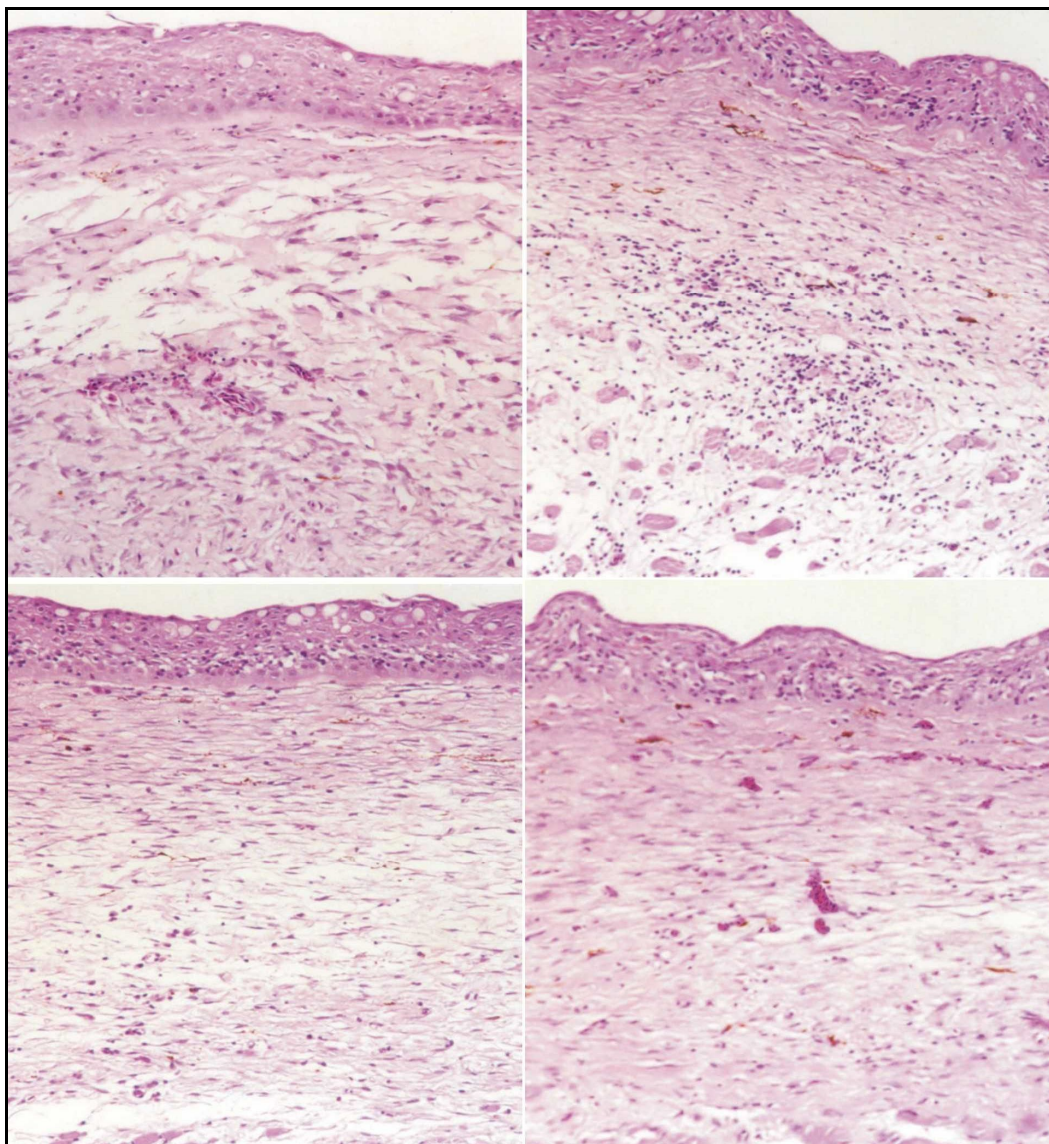
Figura 10. Microscopia das lesões após 14 dias. Em A controle, em B 100 mg de vitamina/kg; C 200 mg de vitamina/kg; D 500 mg de vitamina/kg. As fibras colágenas (Fc) não estavam alinhadas no grupo controle (A); alinhadas no grupo de 100mg, apenas na derme superficial (B), e totalmente alinhadas nos grupos com (200mg e 500mg (C e D). Em A e B o tecido conectivo apresenta-se mais edemaciado. HE. 455x. Moraes et al.(2003).

Neste trabalho, a infiltração de células inflamatórias foi notada a partir do terceiro dia, atingindo o máximo no sétimo dia (Tabela 10). Inicialmente predominavam os granulócitos e, após o terceiro dia, os mononucleares, em particular macrófagos. O ácido ascórbico parece não ter interferido nesse fenômeno, embora favoreça o acúmulo de macrófagos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo da mesma espécie de peixe (Petric et al.,

2003b). Talvez o modelo de estudo da cicatrização não seja adequado para evidenciar tal fato.

Tabela 10. Número de células inflamatórias presentes em um milímetro quadrado de epiderme após os diferentes tempos (dias) de observação. Grupo C (controle), grupo C1 (100 mg de vitamina/kg de ração), grupo C2 (200 mg de vitamina/kg de ração) e grupo C5 (500 mg de vitamina/kg de ração). (n=7).

Dias	C	C1	C2	C3
1	0a	0a	0a	0a
3	557a	355a	538a	538a
7	1279b	1942a	1498b	1288b
14	673ab	519b	855a	548b
21	1250a	259b	336b	154b
28	250a	240a	326a	144a
35	394a	269ab	144b	134b

Em cada linha, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As avaliações demonstraram que a reepitelização aconteceu de forma homogênea, sem diferença entre os grupos, completando-se em menos de 24 horas. Nesse fenômeno não ocorre meiose de células epiteliais e a cobertura da ferida se faz pela expansão das células vizinhas da epiderme sadia (Mittal & Munshi, 1974; Quilhac & Sire, 1999). Essa rápida reepitelização é importante para evitar desequilíbrio osmótico e/ou agressão por patógenos oportunistas.

A quantidade de células mucosas (Tabela 11) presentes a partir das primeiras vinte e quatro horas aumentou progressivamente e os grupos que receberam ração suplementada com vitamina C, apresentaram aumento significativamente mais rápido dessas células. Esse aumento pode ter papel relevante, visto que o muco produzido pela maior quantidade de células é rico em lisozimas e anticorpos, os quais combatem os agentes patógenos eventualmente presentes (Noga, 1996).

Tabela 11. Número médio de células mucosas presentes em um milímetro quadrado de epiderme nos diferentes dias de observação. Grupo C0 (controle), grupo C1 (100 mg de vitamina/kg de ração), grupo C2 (200 mg de vitamina/kg de ração) e grupo C5 (500 mg de vitamina/kg de ração). (n=7).

Dias	C0	C1	C2	C5
1	0a	0a	0a	0a
3	6a	7a	12a	20a
7	17a	12a	29a	22a
14	14c	44ab	57a	34b
21	39b	76a	66a	65a
28	64a	67a	53a	54a
35	43b	81a	67a	81a

Em cada linha, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p<0,05$.

A angiogênese foi máxima no sétimo dia e diminuiu a partir do décimo quarto dia, até se tornar ausente no trigésimo quinto dia (Tabela 12). Os resultados sugerem que, em relação à evolução da angiogênese, os grupos suplementados com 100 e 200 mg de vitamina C/kg de ração estariam em posição intermediária entre controle e C5 (500mg). Então esses resultados apontam no sentido de que a suplementação com vitamina C acelerou a angiogênese favorecendo a evolução do processo cicatricial, seguindo uma relação de dose e efeito.

Tabela 12. Número médio de neovasos presentes em um milímetro quadrado de epiderme nos diferentes dias de observação. Grupo C0 (controle), grupo C1 (100 mg de vitamina/kg de ração), grupo C2 (200 mg de vitamina/kg de ração) e grupo C5 (500 mg de vitamina/kg de ração). (n=7).

Dias	C	C1	C2	C5
1	0a	0a	0a	0a
3	0a	19a	19a	0a
7	240a	230a	173b	134b
14	144a	86b	95b	86b
21	86a	58a	48a	48a
28	29a	10a	10a	10a
35	0a	0a	0a	0a

Em cada linha, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A proliferação fibroblástica começou a ser observada no sétimo dia, e foi mais intensa no grupo C5 (500mg de vitamina C/kg). As fibras colágenas estavam presentes, mas de forma desorganizada. Aos quatorze dias, elas se mostraram em quantidade maior e mais organizadas. Foi possível observar que sua proporção foi menor no grupo controle, embora o número de fibroblastos não aparentasse diferença. Tais fatos sugerem a influência da vitamina C no incremento da produção de colágeno, mas não na proliferação de fibroblastos. A partir do décimo quarto dia, havia maior produção e alinhamento das fibras colágenas de forma diferenciada entre os grupos, evidenciando que maiores quantidades de vitamina C na ração propiciaram maior rapidez e eficiência no reparo das lesões.

Os resultados, tomados em conjunto, demonstram que as características morfológicas diferiram entre os peixes alimentados com os diferentes tipos de ração. Nos que receberam a dieta suplementada com vitamina C a cicatrização apresentou cinética mais intensa, acelerando proliferação de células mucosas, o acúmulo de colágeno, a remodelação tecidual e a formação de escamas, levando à redução proporcional da área lesada, seguindo a relação de dose e efeito. Todavia, não interferiu no processo de re-epitelização. Pelo menos em parte, esses fatos podem resultar do maior acúmulo de células inflamatórias na fase de demolição, como na maior atividade de fibroblastos que condiciona a produção de colágeno e organização do novo tecido que irá constituir a cicatriz. Então a vitamina C proporciona efeitos diretos sobre os constituintes do tecido conectivo como na produção de colágeno, assim como proporciona incremento do patamar homeostático com melhora de várias respostas de defesa.

Vitamina E

A - Suplementação alimentar com vitamina E na inflamação crônica por corpo estranho em pacus mantidos em duas densidades de estocagem

A vitamina E atua como antioxidante de membranas biológicas e a sua deficiência associada ou não à de ácidos graxos insaturados está relacionada ao aumento da peroxidação lipídica (Smith, 1979; Blazer & Wolke, 1983; Moccia et al., 1984; Wada et al., 1989, 1991).

A deficiência de vitamina E reduz a quantidade de macrófagos peritoniais no bagre do canal e a atividade de linfócitos T e B em trutas arco-íris (Blazer & Wolke, 1983). Essa mesma espécie alimentada com ração suplementada com vitamina E apresenta aumento do título de anticorpos contra *Yersinia ruckeri* (Ndoye et al., 1990; Verlhac et al., 1993). Ortuño et al. (2001) demonstraram que *Sparus aurata,* alimentados com ração suplementada com vitamina E, exibiram aumento das atividades fagocítica e do sistema complemento.

Neste ensaio *in vivo* de Belo et al. (2005) foi investigado o efeito da vitamina E e de diferentes densidades de estocagem (5 kg/m^3 e 20 kg/m^3) sobre o acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos policariontes em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de pacus *Piaractus mesopotamicus* mantidos.

Os peixes foram alimentados com ração contendo diferentes níveis de DL-α-acetato de tocoferila, sendo zero (dieta basal), 100 e 450 mg de

vitamina E/kg de ração, durante 20 semanas a 2% da massa corporal. Após esse período as lamínulas foram implantadas no tecido subcutâneo e avaliadas após 2, 7 e 15 dias depois (Petric et al., 2003a).

Peixes alimentados com ração suplementada com 450 mg de vitamina E/kg apresentaram aumento no acúmulo de macrófagos mononucleares, células gigantes do tipo corpo estranho e do tipo Langhans (Figura 11).
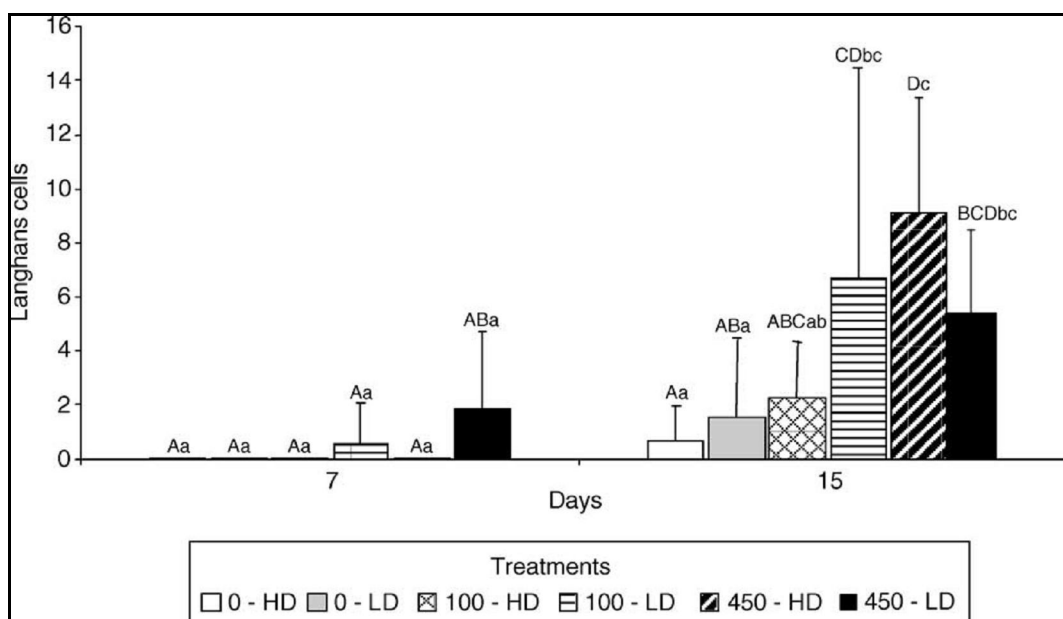
Figura 11. Número de gigantócitos de Langhans contados em lamínulas de vidro retiradas de pacus alimentados com ração suplementada com 0, 100 e 450 mg de vitamina E/kg de ração e mantidos em baixa (LD) ou alta (HD) densidade. Média ± desvio padrão. Teste de Tukey, $p<0,05$. Comparação entre tratamentos letras maiúsculas para comparação e letras minúsculas entre cada tempo de análise.

A cinética do acúmulo de macrófagos e a formação de gigantócitos policariontes sofreu interferência da suplementação alimentar, desde que os peixes não suplementados e mantidos em alta densidade apresentaram menor quantidade de células aderentes às lamínulas e mais alta concentração de cortisol plasmático.

Por outro lado, peixes que receberam dieta suplementada com 450 mg de vitamina E não apresentaram diferença em relação às concentrações de cortisol plasmático relacionadas às densidades de estocagem. O efeito da concentração de cortisol sobre o metabolismo de carboidratos, avaliado pela glicemia não foi claro, pois não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 12).
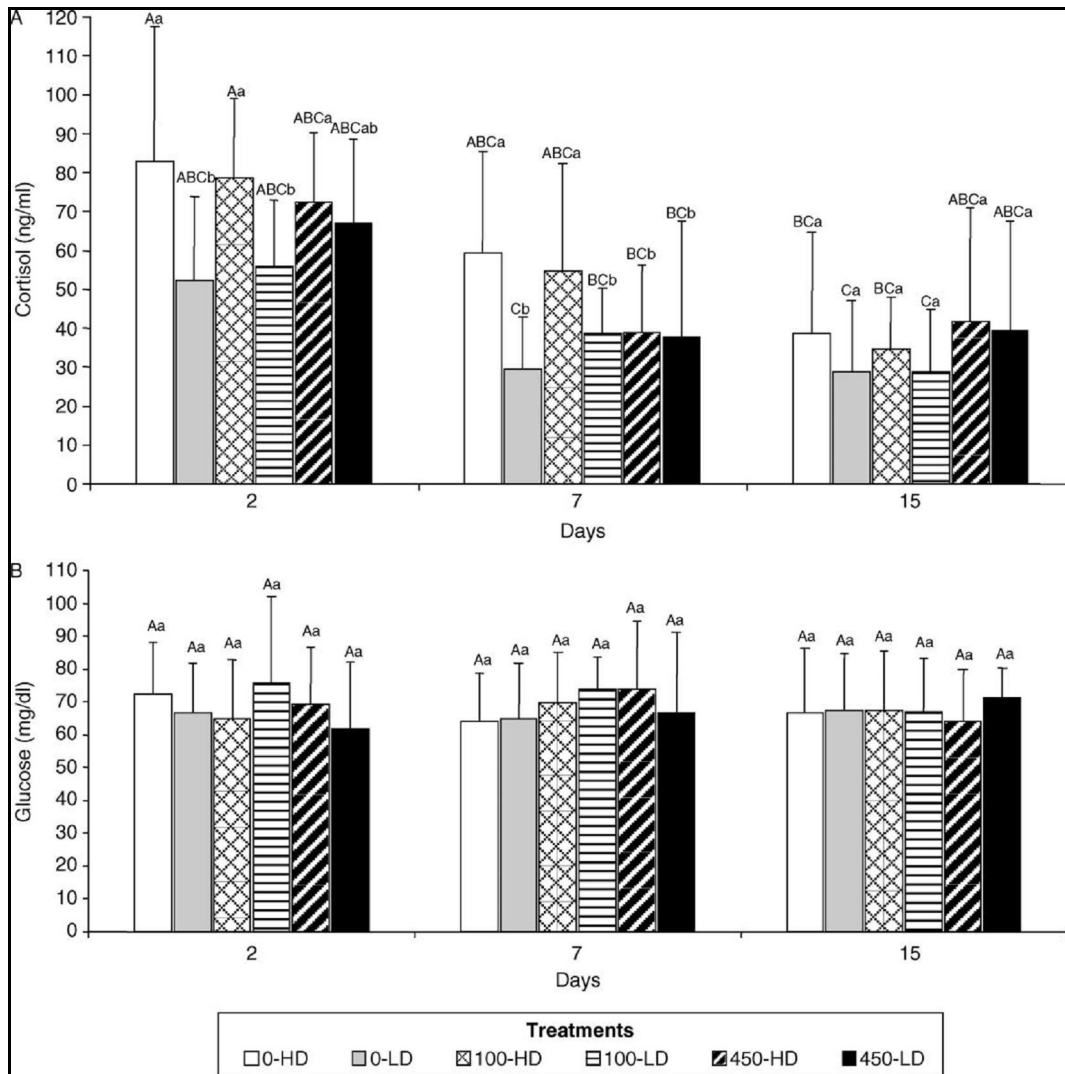
Figura 12. Concentrações plasmáticas de cortisol (A) e glicemia (B) em pacus que receberam suplementação com 0, 100 e 450 de vitamina E foram mantidos em alta e baixa densidade de estocagem (HD e LD). Os dados são representados por média ± desvio padrão. Nível de significância estatística ($p<0,05$) entre os tratamentos estão indicados por letras maiúsculas (para comparação entre diferentes dias de experimento), as minúsculas entre cada dia de análise. (n=7). Teste de Tukey.

Os resultados sugerem que nas condições deste ensaio, a ração suplementada com vitamina E contribuiu, pelo menos em parte, para o acúmulo de macrófagos e com o incremento da formação de gigantócitos policariontes na lesão inflamatória crônica por corpo estranho. Esse efeito pode ser decorrente da redução da menor liberação de cortisol endógeno

diminuindo a imunosupressão e favorecendo a resposta dos macrófagos (para detalhes ver Belo et al., 2005).
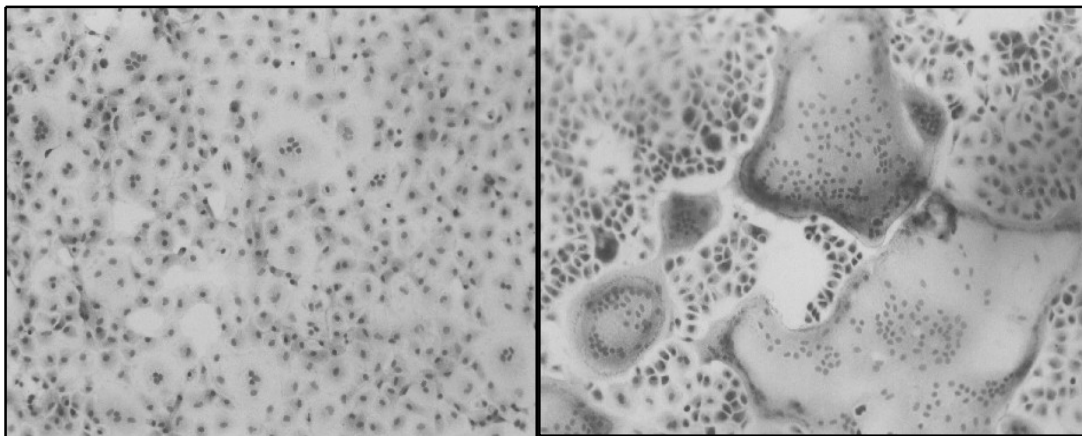
Figura 13. Aspecto microscópico das células presentes nas lamínulas implantadas por três dias em A onde há macrófagos isolados e pequenos policariontes (esquerda) e gigantócitos tipo corpo estranho e de Langhans após 15 dias de implante (direita). Belo et al. (2005).

B - Suplementação alimentar com vitamina E na evolução do processo cicatricial

Dando continuidade às investigações sobre os efeitos nutracêuticos da vitamina E este trabalho teve como objetivo avaliar as consequências da suplementação alimentar com vitamina E sobre a cinética da evolução do processo de reparo de feridas cutâneas de tilápias do Nilo jovens (Iwashita et al., 2009).

Após aclimatação, em nove aquários os peixes receberam ração livre de vitamina E, e em outros nove aquários, a dieta foi suplementada com 450 mg de vitamina E/kg de ração, misturada, peletizada, e estocada em sacos plásticos escuros, a 4 ºC negativos. Após 60 dias de alimentação as feridas cutâneas foram induzidas cirurgicamente de acordo com Moraes et al. (2003) e amostras de tecido das margens das lesões foram colhidas depois de 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias.

O cálculo da área de lesão foi realizado por planimetria e a porcentagem de regressão da área lesada dada pelo índice calculado pela equação IR = (AI x AF / AF) x 100, onde índice de retração (IR); AI – área inicial (AI); AF – área final.

Parte das amostras de tecido colhidas para exame microscópico foi fixada em solução de Bouin e submetida às técnicas de rotina para inclusão em parafina. Outra foi fixada em formalina a 10%, e estocada por sete dias

em PBS. A seguir, foi desidratada em séries crescentes de álcool e imersa em resina. Os blocos de resina e parafina foram cortados na espessura de dois a cinco micrômetros, corados com hematoxilina-eosina acrescida de ácido periódico de Schiff (PAS), reação de sirius red (Junqueira et al., 1982) e azul de toluidina a 1% (Hopwood, 1990; Santos & Oliveira, 2007).

Os cortes histológicos foram examinados em microscopia de luz para histomorfometria de células mucosas (MC), cromatóforos (CRM), neovascularização (NEO), células inflamatórias (CI), fibroblastos (FB), colágeno (CG) e escamas (ESC). Foram considerados cinco campos por corte de cinco camadas representadas em replicatas para cada um de cinco tempos de avaliação, e quatro tratamentos. A histomorfometria foi realizada na derme e os resultados submetidos à análise de variância (ANOVA), aplicando o teste F ($p<0.01$) entre tratamentos. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (SAS program version 9.1).

Pela avaliação macroscópica verificou-se que no grupo controle (não suplementado) as feridas mantiveram o formato retangular original durante todo o período de observação. No grupo que recebeu ração suplementada, após 28 dias as feridas eram elípticas ou ovais. A coloração variou de rosada no início do ensaio a acinzentada no período final.

O índice de retração das feridas apresentou diferença estatística ($p<0.01$) sendo maior nos grupo alimentado com dieta suplementada (Tabela 13).

O número de células inflamatórias presentes na área de feridas que acelerou a fase de demolição, bem como do maior número de células mucosas, cromatóforos e fibras colágenas como expresso nas Tabelas 14 e15. Os resultados indicam que os peixes que receberam dieta suplementada com vitamina E apresentaram incremento de sua capacidade de cura das feridas.

Tabela 13. Comparação da área de ferida (cm^2) de tilápias do Nilo entre o grupo controle e o alimentado com dieta suplementada com vitamina E, durante a evolução do processo cicatricial.

Variavel	Tratmento	Tempo				
		3	7	14	21	28
Area (cm^2)	Controle	2.29	2.16	1.83	1.73	1.69
	Vitamina E	2.40^b	1.95^a	1.56^b	1.38^a	1.27^b
	Geral	2.35^A	2.05^B	1.70^C	1.56^C	1.46^C

Tabela 14. Comparação entre as contagens de células mucosas (MC), cromatóforos (CRM), neovascularização (NEO), células inflamatórias (IC) e escamas (ESC) na pele de tilápias do Nilo, entre o grupo controle e o alimentado com ração suplementada durante a cicatrização.

Variável	Grupos	Tempo				
		3	7	14	21	28
MC	Controle	1.87^{Ea}	2.71^{Da}	3.32^{Ca}	4.06^{Bb}	5.22^{Aa}
	Vit. E	1.67^{Ea}	2.87^{Da}	3.55^{Ca}	4.92^{Aa}	4.13^{Bb}
CRM	Control	2.12^{Ea}	2.86^{Db}	3.76^{Cb}	8.76^{Aa}	6.17^{Bb}
	Vit. E	2.12^{Ea}	3.82^{Da}	4.38^{Ca}	6.34^{Bb}	6.79^{Aa}
NEO	Control	2.63^{Eb}	3.10^{Bb}	3.25^{Aa}	2.86^{Ca}	2.64^{Da}
	Vit. E	3.51^{Ba}	3.68^{Aa}	3.08^{Ca}	2.61^{Da}	2.27^{Ea}
IC	Control	2.09^{Db}	2.61^{Ba}	2.79^{Aa}	2.27^{Ca}	2.07^{Eb}
	Vit. E	3.29^{Aa}	2.53^{Ca}	2.69^{Ba}	1.87^{Eb}	2.42^{Da}
ESC	Control	1.03	1.08	1.08	1.07	1.00
	Vit. E	1.01	1.07	1.03	1.03	1.00

Tabela 15. Porcentagem de fibras colágenas na ferida da pele de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, no grupo controle e no alimentado com dieta suplementada com vitamina E, durante a evolução do processo cicatricial.

Dias	Fibras colágenas (%)			
	Organizado		Não organizado	
	Controle	Vitamina E	Controle	Vitamina E
3	8.5	10.8	92.5	89.2
7	14.5	12.5	62.5	77.5
14	21.33	28.66	78.66	71.33
21	22.75	29.57	77.25	70.43
28	27.8	46.16	72.2	53.83

A re-epitelialização foi evidente três dias após a injúria corroborando os resultados de Moraes et al. (2003) em pacus e de Wahli et al. (1986) em trutas arco-íris *Onchorhyncus mykiss* alimentadas com dieta suplementada com vitamina C, e não diferiu do grupo que não recebeu a dieta suplementada, fato que ocorreu também neste ensaio. Essa re-epitelialização precoce é relevante, pois providencia barreiras e impede a exposição do tecido subepitelial a infecções oportunistas e desbalanço osmóstico (Moraes et al., 2003; Roubal, 1986; Bullock, 1978a, b).

A maior proliferação de células mucosas nos peixes que receberam a alimentação suplementada com vitamina E, também favorece os mecanismos de cura, uma vez que o muco é rico em lisozima, anticorpos e ácidos graxos de baixo peso molecular de importância como atributos de defesa contra agentes patógenos (Noga, 1996).

A marcante presença de cromatóforos nos peixes alimentados com dieta suplementada tem importância do ponto de vista da resposta inflamatória (Angius & Roberts, 2003). O aumento do pigmento pode estar relacionado com a dieta suplementada com vitamina E, como também verificado por Belo (2006) em lesões crônicas induzidas por corpo estranho associado ao *Mycobacterium marinum.* Nas reações enzimáticas para a produção de melanina, possivelmente haveria alguma substância com ação bactericida auxiliando no combate a presença eventual de agentes microbianos

A perfusão sanguinea adequada é essencial à cura de feridas por carrear oxigênio e nutrientes necessários para que os processos vitais ocorram. Assim a neovascularização mais acentuada nos peixes que receberam dieta suplementada tem relevância no processo, como verificado por Moraes et al. (2003) e Anderson & Roberts (1975) em relação à vitamina C na cura de feridas cutâneas. Com base nesses fatos, as vitaminas E e C ministradas isoladamente, aceleram e favorecem a agiogênese na área lesada.

A porcentagem de fibras colágenas organizadas em arranjo paralelo à superfície cutânea foi maior no grupo que recebeu a suplementação.

No terceiro dia a quantidade de células inflamatórias ($x = 3,29$) e neoformação vascular ($x = 3,68$) foram máximas para os peixes do grupo suplementado com a vitamina E, quando comparando com o grupo controle. O tecido conectivo frouxo da derme apresentou dissociação das fibras colágenas, evidenciando sinais de edema em ambos os grupos, mais pronunciada no grupo controle.

No sétimo dia o grupo alimentado com dieta suplementada apresentou organização epidérmica e dérmica mais evidente que no grupo controle. Neste grupo, identificou-se maior quantidade de células mucosas (CM) e de fibras de colágeno paralelas à camada basal. Epiderme hiperplásica foi observada somente no grupo controle demonstrando que a hipovitaminose E incrementou a hiperplasia destas células. Fibroblastos e fibras colágenas foram observados nas lesões em todos os grupos em todos os tempos (Figura 14).

No 14º dia a quantidade de células inflamatórias (CI) para os peixes que receberam ração não suplementada foi máxima ($x = 2,79$). A hiperplasia epidérmica e dérmica mostrou-se evidente. As fibras colágenas do grupo controle ainda mantiveram configuração desorganizada enquanto que as

fibras do grupo suplementado apresentaram disposição paralela em relação à camada basal (Figura 14).

No 21º dia a quantidade de células mucosas foi máxima no grupo com dieta suplementada com a vitamina (x = 4,92). Na derme, constatou-se alinhamento das fibras colágenas no grupo suplementado. A quantidade de cromatóforos atingiu sua quantidade máxima para o grupo controle neste estágio (x = 8,76) (Figura 14).

No 28º dia a quantidade de CM foi máxima no grupo controle (x = 6,79), bem como a contagem de cromatóforos (CRM), que foi máxima para o grupo alimentado com dieta suplementada neste estágio (x = 5,22) (Figura 14).

Na avaliação das médias dos valores de células mucosas, foi observada diferença significativa ($p<0,01$) entre as médias nos 21º e 28º dias, na interação do tratamento com tempo. A contagem geral de cromatóforos diferiu estatisticamente entre os grupos controle e suplementados entre as médias nos dias 7, 14, 21 e 28, sendo maiores os valores para o grupo suplementado nos 3º, 14º e 28º dias.

Os resultados de histomorfometria mostraram que a formação de neovasos (NEO), apresentou interação entre os tratamentos e demonstraram diferença estatística entre eles ($p<0,01$). As médias da contagem de NEO diferiram entre os tratamentos dos dias três e sete, onde os valores obtidos para o número de neovasos foram maiores no grupo suplementado. Analisando-se as médias gerais obtidas da contagem de células inflamatórias (CI), foi observada diferença significativa entre os tratamentos, demonstrando que a suplementação vitamínica favoreceu a migração de células inflamatórias para o foco da lesão, nos 3º, 21º e 28º dias de coleta. Não foram observadas diferenças significativas para a contagem de escamas (ESC).

Os resultados mostraram que em todos os tempos de observação, a organização das fibras colágenas foi maior no grupo que recebeu dieta suplementada, demonstrando que o paralelismo das fibras é diretamente proporcional ao grau de organização.
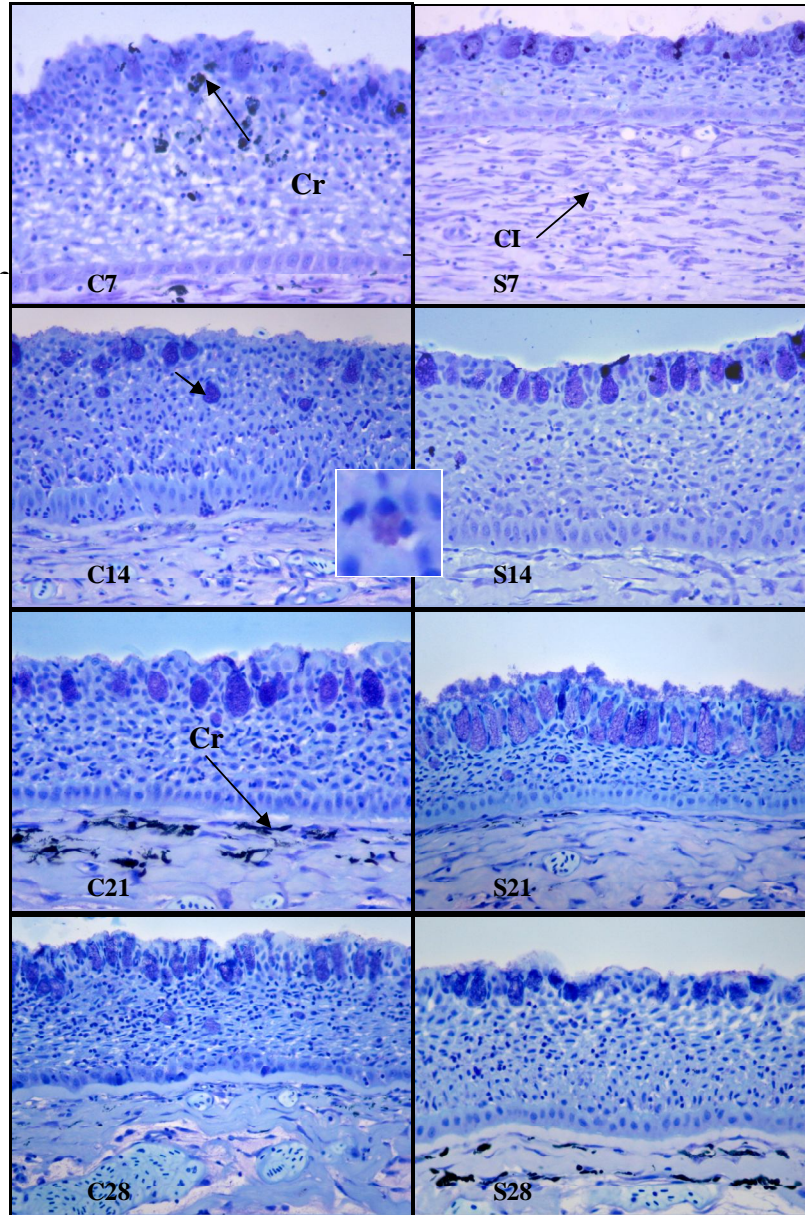
Figura 14. Fotomicrografia de pele de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus,* no 7º, 14º, 21º e 28º dias após a indução das lesões. Grupo controle (C), Grupo Suplementado (S) com 450 mg de vitamina E.kg^{-1} de ração. Célula mucosa (seta), Células inflamatórias (CI), Cromatóforo (Cr). Azul de toluidina. Escala = 100 µm. Iwashita et al. (2009).

Os resultados apresentados sugerem que a vitamina E tem efeitos benéficos na produção de colágeno, contribuindo para o processo de cura. Além disso, a vitamina E diminui a reabsorção de matriz óssea e estimula a

proliferação de colágeno, possivelmente por inibir a produção de interleucina 1 e 6 como verificado em mamíferos (Lall & Lewis-McCrea, 2007).

Com base nesses resultados é possível concluir que a suplementação dietética com 450 mg vitamina E/kg de ração facilita o processo de cura de feridas cutâneas em tilápias do Nilo, pois incrementa a produção de colágeno e diminui a concentração plasmática de cortisol e a imunosupressão como verificado por Belo et al. (2005). (Para detalhes ver Iwashita et al., 2009).

Efeito de suplementação alimentar com vitaminas C e E nas variáveis hematológicas e desafio com bactérias *A. hydrophila*

Os efeitos benéficos das vitaminas C e E são, em geral, estudados individualmente (Gill, 1991, Wahli et al.,1986, Li & Lovell, 1985, Ndoye et al., 1990; Verlhac et al., 1993; Petric et al., 2003b; Brum, 2003; Belo et al., 2005). Porém, são escassos os estudos que associam a suplementação de ambas na dieta de peixes e pouco se conhece sobre essa associação.

Em *Salmo salar* foram identificados dois mecanismos de interação entre as vitaminas C e E, sendo um de efeito sinérgico de proteção simultânea das fases lipídica e aquosa contra oxidação e outro em que há ação da vitamina C na regeneração da vitamina E nos tecidos. Resultados de estudos sobre crescimento, mortalidade, hematologia e oxidação lipídica no fígado demonstram que a vitamina C protege o peixe da deficiência de vitamina E (Hamre et al., 1997).

A suplementação com vitamina C em altos níveis, três vezes maior que o adequado, pode suprir a ausência de vitamina E na dieta (Shiau & Hsu, 2002).

O uso de megadoses de vitaminas C (3 g/kg) ou E (1,2 g/kg) e sua associação em *Sparus aurata*, demonstrou efeito sinérgico, com incremento nas atividades respiratória e fagocítica (Ortuño et al., 2001), mas foi ineficaz contra a infecção experimental por *Streptococcus iniae* (Sealey & Gatlin III, 2002).

Garcia et al. (2007) avaliaram o efeito da suplementação com 250 e 500 mg de vitamina C e/ou E/kg de ração sobre variáveis hematológicas de *P. mesopotamicus* desafiados com *A. hydrophila.* Os peixes foram alimentados durante 60 dias com dieta isenta de vitaminas C e E. Após esse período as dietas-teste foram oferecidas por 60 dias quando foi realizado o desafio com 6 x 10^8 UFC e *A. hydrophila*/peixe (DL50 previamente estabelecida). Antes e depois do desafio as variáveis hematológicas foram avaliadas. Observou-se efeito da interação entre as vitaminas C e E sobre os valores do hematócrito, que aumentaram tanto em peixes alimentados com dieta desprovida de vitamina E (0 mg/kg) associada à alimentação com baixos níveis de vitamina C (0 ou 250 mg/kg), quanto em peixes que receberam os maiores níveis de ambas. Os resultados sugerem que esta resposta possa estar relacionada tanto à deficiência vitamínica quanto à hipervitaminose. Possivelmente, a suplementação com 500 mg/kg de vitamina C associada ao mesmo nível de vitamina E, possa ser excessiva para a espécie estudada (Tabela 16).

Observou-se que 24 horas após o desafio houve aumento no número de neutrófilos e monócitos, corroborando resultados obtidos em trutas arco-íris infectadas por *Vibrio anguillarum* (Lamas et al., 1994) e salmão do

Atlântico por *Renibacterium salmoninarum* (Bruno & Munro, 1986). Observou-se redução do número de trombócitos e linfócitos 24 horas após o desafio (Tabela 17-18).

Neste estudo, observou-se a interferência da suplementação alimentar com vitamina C sobre o número de trombócitos e eritroblastos. Antes do desafio ocorreu incremento no número de trombócitos proporcional ao nível de vitamina C da dieta. No entanto, após o desafio, houve redução nos valores de trombócitos apenas no grupo de peixes que recebeu o maior nível de vitamina C, sugerindo que essas células tenham sido mobilizadas do compartimento sanguíneo para o foco infeccioso. Quanto aos eritroblastos, peixes que receberam o maior nível da vitamina C (500 mg/kg) apresentaram menor número dessas células no sangue (Figura 15).

Tabela 16. Análise estatística dos parâmetros hematológicos em *P. mesopotamicus* alimentados com diferentes níveis de vitamina C e/ou E na ração, antes e depois do desafio com *A. hydrophila*.

Estatística	Variáveis Eritrócito ($x1000/mm^3$)	Hemoglobina (g %)	Hematócrito (%)	Proteína total (g/dl)	Globulina (g/dl)
F para BL	3,28*	1,83 ns	3,94*	0,41 ns	1,00 ns
F para VC	1,17 ns	4,10*	1,25 ns	1,61 ns	1,78 ns
F para VE	0,51 ns	5,53**	6,97*	0,98 ns	0,50 ns
F para VC x VE	1,79 ns	3,04*	4,97*	0,35 ns	0,46 ns
F para PR	4,15*	3,13 ns	0,39 ns	64,38**	53,18**
F para VC x PR	1,09 ns	1,16 ns	1,58 ns	0,15 ns	0,14 ns
F para VE x PR	0,59 ns	0,27 ns	0,16 ns	0,76 ns	0,23 ns
F para VC x VE x PR	1,29 ns	0,76 ns	1,76 ns	2,10 ns	0,99 ns
CV	0,57	0,79	0,78	0,86	0,81
CV para parcelas	7,91	6,65	5,29	11,82	15,79

Estatística	Variáveis VCM (fl)	HCM (%)	CHCM (%)	Trombócito ($x1000/mm^3$)	Eritroblasto ($x1000/mm^3$)
F para BL	2,48 ns	1,24 ns	2,35 ns	0,82 ns	4,61*
F para VC	0,84 ns	0,05 ns	3,25*	3,02 ns	3,55*
F para VE	2,15 ns	2,04 ns	0,01 ns	0,21 ns	0,43 ns
F para VC x VE	0,92 ns	0,32 ns	4,02**	1,62 ns	0,62 ns
F para PR	2,44 ns	6,22*	7,82*	12,62**	5,45*
F para VC x PR	0,44 ns	0,43 ns	0,02 ns	4,33*	1,28 ns
F para VE x PR	0,81 ns	0,68 ns	0,31 ns	1,76 ns	0,19 ns

BL: bloco; VC: vit. C; VE: vit. E; PR: período; *p<0,05; **p<0,01 as variáveis apresentam F Levene para homogeneidade de variância p>0,05 e X^2 para normalidade (Shapiro Wiks) p>0,05.

Tabela 17. Estatística da contagem total de leucócitos (Le), linfócitos (Li), monócitos (Mo), neutrófilos (Ne), eosinófilos (Eo) e leucócitos granular PAS-postivos (LG-PAS) no sangue de *P. mesopotamicus* com dieta suplementada com diferentes níveis de vitamina C e/ou E, após o desafio com *A. hydrophila*.

	Variável x1000/µL)					
Estatística	Le	Li	Mo	Ne	Eo	LG-PAS
F para BL	1,10^{ns}	1,95^{ns}	1,54^{ns}	4,40**	0,62^{ns}	0,81^{ns}
F para VC	0,20^{ns}	0,30^{ns}	0,12^{ns}	0,52^{ns}	0,82^{ns}	1,61^{ns}
F para VE	0,18^{ns}	0,39^{ns}	0,74^{ns}	0,94^{ns}	0,30^{ns}	2,22^{ns}
F para VC x VE	1,16^{ns}	1,03^{ns}	0,82^{ns}	0,72^{ns}	1,50^{ns}	2,91*
F para PR	45,31**	63,12**	7,46*	16,94**	6,21*	3,80^{ns}
F para VC x PR	0,62^{ns}	0,61^{ns}	0,91^{ns}	0,10^{ns}	0,34^{ns}	2,88^{ns}
F para VE x PR	2,36^{ns}	1,72^{ns}	3,59^{ns}	2,39^{ns}	0,76^{ns}	5,51**
F para VC x VE x PR	0,51^{ns}	0,56^{ns}	0,84^{ns}	0,91^{ns}	1,05^{ns}	2,58^{ns}
CV	65,51	0,74	63,78	91,76	0,63	0,72
CV Parcelas	51,72	56,69	64,87	62,81	166,43	192,25

BL: bloco; VC: vitamina C; VE: vitamina E; PR: período; *p<0,05; **p<0,01; todas as variáveis apresentam F Levene para homogeneidade de variância P>0,05 e X^2 para normalidade (Shapiro Wiks) p>0,05.

Tabela 18. Valores médios dos parâmetros hematológicos em *P. mesopotamicus* alimentados com diferentes níveis de vitamina C e E na ração, antes e depois do desafio com *A. hydrophila*.

Vitamina C	Antes do desafio	Depois do desafio
	Trombócitos (x10^3/µL)	
0	62,21^{Ba}	52,61^{Aa}
250	74,53^{ABa}	68,68^{Aa}
500	90,40^{Aa}	50,25^{Ab}
Vitamina E	Monócitos ((x10^3/µL))	
0	1,27^{b}	3,63^{a}
250	1,70	2,13
500	2,08	2,26
	LG-PAS (x10^3/µL)	
0	0,39^{B}	0,69
250	1,74^{Aa}	0,25^{b}
500	0,52^{B}	0,37

Médias seguidas de letras iguais nas linhas ou colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05); letras minúsculas para comparação entre linhas e maiúsculas para comparação entre colunas.
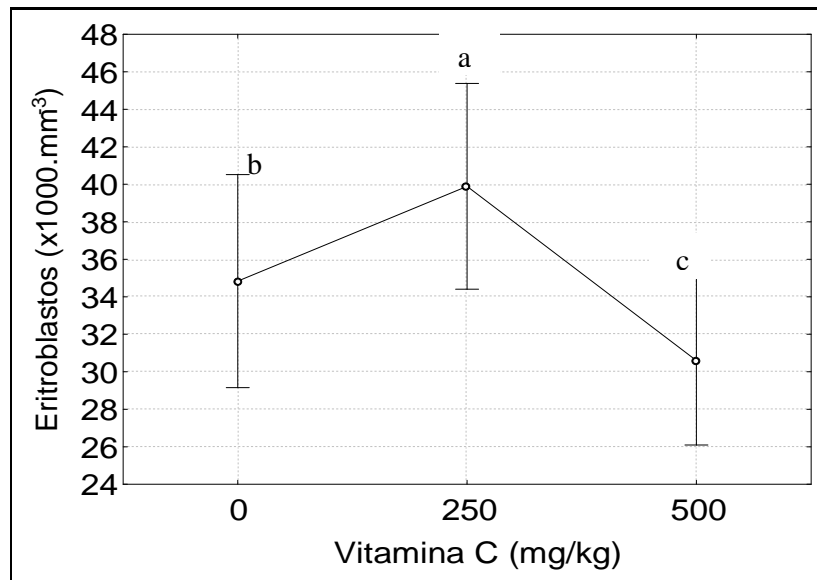
Figura 15. Comparação de médias do número de eritroblastos do sangue de *P. mesopotamicus* alimentados com 0, 250 e 500 mg de vitamina C.

Na resposta inflamatória aguda ocorrem neutrofilia e monocitose no sangue e acúmulo de neutrófilos e macrófagos no local agredido (Secombes, 1996; Roberts, 1981). Em peixes, a neutrofilia inicia-se uma hora após os estímulos inflamatórios e comumente atinge o máximo em 48 horas (Secombes, 1996). A injeção intraperitoneal de *Vibrio alginolyticus* em *Pleuronectes platessa* provoca acúmulo de fluído na cavidade com presença de neutrófilos e macrófagos (MacArthur et al., 1984). No presente estudo, apesar de não terem sido realizadas as análises dos fluidos, observou-se que 24 horas após o desafio com a *A. hydrophila* houve aumento no número de neutrófilos e monócitos no sangue, corroborando estudos de Lamas et al*.* (1994) e Bruno & Munro (1986), em que também ocorreu aumento dessas células no sangue.

Os primeiros eventos da inflamação são as alterações vasculares que incluem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, seguidos do acúmulo de células com atividade de defesa. O patógeno é rapidamente circundado por células fagocíticas com atividade microbicida, que impedem sua expansão ou o remove. O acúmulo de células no foco inflamado foi confirmado por estudos da componente celular da inflamação induzida na bexiga natatória por tioglicolato, *A. hydrophila* e endotoxina (LPS) de *Escherichia coli* em *P. mesopotamicus*, em que Bozzo et al. (2007) demonstraram a predominância de trombócitos, acompanhados de menor quantidade de linfócitos, enquanto que macrófagos e granulócitos foram mais escassos desde as avaliações iniciais, independentemente do estímulo inflamatório.

Há evidências de que a suplementação alimentar com 500 mg de vitamina C/kg de ração acelerou e aumentou o acúmulo de macrófagos bem

como a formação de macrófagos policariontes em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de *P. mesopotamicus* (Petric et al., 2003b). Neste ensaio, observou-se a interferência da suplementação com vitamina C no número de trombócitos e eritroblastos do sangue, sendo que antes do desafio ocorreu incremento no número de trombócitos de acordo com nível de vitamina C da dieta. No entanto, após o desafio, houve redução nos valores dessas células apenas no grupo que recebeu o maior nível de vitamina C, sugerindo a migração mais rápida dessas células aos focos lesados. Quanto aos eritroblastos, peixes alimentados com o maior nível da vitamina C (500 mg/kg) apresentaram menor número dessa célula no sangue.

Dos resultados descritos acima se conclui que para peixes de cativeiro em sistema intensivo, em que a principal fonte de nutrientes é oriunda da ração oferecida, a suplementação com as vitaminas C e E é essencial para o bom funcionamento do sistema imune, apesar de não ter diminuído a taxa de mortalidade frente ao desafio. No entanto, da mesma forma que a deficiência vitamínica deve ser evitada, o excesso das vitaminas pode causar danos aos peixes. De acordo com o quadro hematológico, para *P. mesopotamicus* jovens, nas condições deste ensaio, os níveis de vitaminas C e E recomendados são de 500 e 250 mg/kg de ração, respectivamente (para detalhes veja Garcia et al., 2007).

A suplementação alimentar com vitaminas C e E na inflamação aguda

A inflamação aguda foi avaliada em dois ensaios em peixes que receberam ração suplementada com as vitaminas C e E. Bozzo (2007) avaliou a cinética da inflamação aguda induzida na bexiga natatória de pacus, por *A. hydrophila* inativada e tioglicolato após 12 semanas de alimentação suplementada com 500 mg de vitamina C e 500 mg de vitamina E/kg, isoladamente ou associadas. A inflamação foi avaliada 4, 24 e 48 horas depois dos estímulos. Neste estudo não foram utilizadas megadoses, mas sim quantidades de vitamina que levaram em consideração resultados prévios positivos com as suplementações das vitaminas C e E em *P. mesopotamicus* (Petric et al., 2003b; Moraes et al., 2003; Brum, 2003; Belo et al., 2005).

Nos tempos determinados os peixes foram sacrificados por aprofundamento do plano anestésico, o exsudato colhido e o componente celular avaliado. Os resultados demonstraram aumento gradativo do número de células totais acumuladas após 4, 24 e 48 horas para os dois estímulos. Esse fenômeno foi caracterizado pelo acúmulo predominante de trombócitos e linfócitos nos grupos inoculados com *A. hydrophila* e suplementados com a vitamina C, seguidos pelos peixes que receberam vitamina E na ração. Nos grupos injetados com tioglicolato, onde predominaram os linfócitos nos peixes alimentados com dietas contendo as vitaminas C e E, e trombócitos nos que receberam a vitamina C, demonstrando a eficácia das vitaminas, independentemente dos estímulos inflamatórios utilizados.

Nos grupos alimentados com ração suplementada com a associação das vitaminas C e E observou-se maior acúmulo de células totais em relação aos grupos que não receberam dieta suplementada. Essa diferença foi

significativa na quarta hora para o grupo de peixes inoculados com *A. hydrophila* e na 48ª hora para os grupos de peixes injetados com tioglicolato, quando comparados aos grupos que receberam a vitamina C ou E isoladamente (Bozzo, 2007).

Os resultados indicaram que a suplementação da dieta com vitamina C nos peixes inoculados com *A. hydrophila* e tioglicolato potencializaram o acúmulo de trombócitos e linfócitos. Na mesma espécie de peixe, em modelos de inflamação crônica ou de cicatrização, a vitamina C foi efetiva no acúmulo de macrófagos mononucleares e gigantócitos policariontes (Petric et al., 2003b; Brum, 2003) e no incremento do processo de cicatrização de lesões cutâneas (Moraes et al., 2003; Iwashita et al., 2009).

A suplementação com vitamina E potencializou a resposta inflamatória nos peixes inoculados com *A. hydrophila* (24ª e 48ª hora) ou tioglicolato (4ª hora) quando comparados aos peixes que não receberam dieta suplementada. Entretanto, o número de células totais no grupo alimentado com dieta suplementada foi menor que o observado nos que não receberam suplementação. Esse fenômeno foi caracterizado pelo acúmulo dos trombócitos e linfócitos nos grupos inoculados com *A. hydrophila* e suplementados com a vitamina C, seguidos pelos tratados com a vitamina E. O contrário foi observado nos grupos inoculados com tioglicolato, onde predominaram os linfócitos nos peixes alimentados com dietas contendo as vitaminas C e E; trombócitos nos que receberam a vitamina C, demonstrando a eficácia das vitaminas, independentemente do estímulo inflamatório utilizado. A citoquímica foi efetiva na identificação dos tipos celulares presentes no exsudato inflamatório.

Martins et al. (2008) utilizou o mesmo modelo experimental, mas com carragenina e LPS como estímulos inflamatórios em tilápias *O. niloticus* alimentadas com dieta suplementada com 500 mg de vitamina C e 500 mg de vitamina E/kg de ração. Os resultados demonstraram que nos peixes injetados com carragenina e LPS que receberam suplementação vitamínica houve maior acúmulo de células no foco inflamado. A dieta suplementada provocou aumento no número de trombócitos no exsudato em peixes injetados com carragenina e LPS (Tabela 19).

Os resultados de Bozzo (2008) e Martins et al. (2008) dão suporte às observações anteriores de Garcia et al. (2007), de que a associação da vitaminas C e E possivelmente favoreça a resposta inflamatória contra agentes lesivos inertes e outros de natureza biologicamente ativa. Esse suporte estaria relacionado aos efeitos antioxidantes e anti-estressantes dessas vitaminas, que reduzem a liberação de cortisol nos peixes que receberam a dieta suplementada, permitindo uma resposta mais efetiva.

Tabela 19. Valores médios e desvio padrão da contagem diferencial de leucócitos no sangue e de leucócitos totais, trombócitos e macrófagos no exsudato da bexiga natatória de *Oreochromis niloticus* não injetados (SI), injetados com salina (Sal), carragenina (Car) e LPS sem e com suplementação de 500mg de vitamina C e E/kg de ração.

Tratamentos	Sangue			
	Monócito (n°/µL)	Linfócito (n°/µL)	Neutrófilo (n°/µL)	Basófilo (n°/µL)
SI	1422,6±55,7[a]	6200,9±56,0[a]	556,9±41,7[a]	35,7±11,1[a]
SI+Vit	1089,8±63,6[a]	5845,8±280,1[a]	1241,5±253,6[a]	23,8±6,4[a]
Sal	1473,3±124,4[a]	12074,5±618,1[a]	3645,3±562,8[a]	181,0±44,9[a]
Sal+Vit	1317,1±117,6[a]	6912,0±338,9[a]	4553,0±267,7[b]	17,9±9,3[a]
Car	1981,0±211,6[a]	16081,0±946,2[a]	5303,9±790,5[a]	133,9±34,4[a]
Car+Vit	523,4±17,2[a]	4825,1±131,1[a]	2428,9±124,6[a]	22,6±0,49[a]
LPS	2093,1±376,0[a]	13249,9±506,0[a]	7295,9±606,4[a]	261,1±45,1[a]
LPS+Vit	502,5±104,5[a]	2149,8±289,9[b]	6147,7±274,9[b]	0[a]

Tratamentos	Exsudato da bexiga natatória		
	Leucócitos (n°/µl)	Trombócitos (n°/µl)	Macrófagos (n°/µl)
Sal	165,7±58,0[a]	47,6±4,1[a]	7,1±1,0[a]
Sal+Vit	742,9±136,7[b]	178,3±7,0[a]	30,7±1,5[a]
Car	274,3±63,5[a]	713,0±8,2[a]	117,9±4,2[a]
Car+Vit	6335,7±2657,5[b]	1493,3±124,6[a]	461,9±42,1[b]
LPS	9821,4±5619,1[a]	4587,6±1140,7[a]	2034,0±919,3[a]
LPS+Vit	17314,3±4823,4[b]	9671,8±449,5[a]	1385,1±83,4[a]

Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p<0,05$).

Suplementação alimentar com *Saccharomyces cerevisiae* na inflamação aguda

A levedura *Saccharomyces cerevisiae,* um imunoestimulante (Sakai, 1999), pertence à classe dos Ascomycetos (Cozzolino, 1982). Acredita-se que a utilização de glucanos melhore a atividade do sistema imune não específico e aumente a resistência contra certos patógenos (Anderson, 1992; Robertsen et al., 1994; Sakai, 1999). A injeção intraperitoneal de glucano, preparado a partir da parede celular de *S. cerevisiae* em salmão do Atlântico *Salmo* salar aumentou a resistência contra *Vibrio anguillarum, Vibrio salmonicida* e *Yersinia ruckeri* (Robertsen et al., 1990); em bagres I. *punctatus* promoveu aumento da resistência contra *Edwardsiella ictaluri* (Chen & Ainsworth, 1992). A administração do glucano por via oral em salmão do Atlântico

induziu maior proteção contra *V. anguillarum* e *V. salmonicida* (Raa et al., 1992), o que não foi observado por Thompson et al. (1995) ao injetar intraperitoneamente este carboidrato em truta arco-íris *O. mykiss*. Como na maioria dos casos essas substâncias foram injetadas na cavidade peritoneal, devem ter agido como flogógenos, desenvolvendo inflamação não específica no peritônio fazendo com que, pelo menos nessa cavidade, os mecanismos de defesa estivessem em alerta contra agressões, fato que compromete seu efeito como imunoestimulante.

A combinação de todos os componentes da parede celular com o seu material genético produz um estado fisiológico ótimo em peixes devido a múltiplas interações (Kulkarni et al., 1987; Rudolph et al., 1990). A utilização de levedura e de parede celular modificada, como suplemento para “seabream” *Sparus aurata*, aumentou a atividade de lisozimas, de fagocitose e de citocinas em relação aos que não receberam suplementação (Rodríguez et al., 2003).

Em função dessas observações, Reque (2005) avaliou a resposta inflamatória e as variáveis hematológicas de tilápias do Nilo alimentadas com ração suplementada com 2% de levedura *S. cerevisiae* autolisada ou com 0,3% de parede celular. (Reque et al., 2009, no prelo).

A ração utilizada era isoprotéica (30,0% PD), isoenergética (3.300 kcal de ED/kg), isofosfórica (0,7 Pdisp.) e com mesmo nível de fibra bruta (5,0%) (Baccarin & Pezzato, 2001). As exigências nutricionais e os valores de digestibilidade de nutrientes dos ingredientes seguiram as determinações de Miranda et al. (2000), Furuya et al. (2001) e Gonçalves (2003). Assim, dois grupos foram alimentados com a ração sem suplemento, outros dois com ração suplementada com levedura autolisada a 2,0% e outros dois com parede celular a 0,3%. A inflamação aguda foi induzida pela inoculação de $3x10^9$ UFC de *A. hydrophila* inativada na bexiga natatória e a resposta avaliada após 6 e 24 horas.

Nos grupos inoculados com a bactéria as respostas foram mais intensas ($p<0,05$) que nos injetados com salina. Os alimentados com ração suplementada inoculados com *A. hydrophila* acumularam maior número de células totais ($p<0,05$) que os alimentados com dieta não suplementada, após 6 e 24 horas. Os que receberam dieta com parede celular apresentaram maior ($p<0,005$) acúmulo de células totais do que os que receberam levedura.

A contagem diferencial evidenciou predominância ($p<0,05$) de trombócitos e menor número de neutrófilos, macrófagos e linfócitos ($p<0,05$) nos grupos com dieta suplementada, após 6 e 24 horas, em relação aos que não receberam suplemento.

Os peixes alimentados com ração suplementada com levedura ou parede celular de levedura apresentaram incremento da inflamação inespecífica sugerindo efeito benéfico para o sistema de defesa (Tabelas 20-21).

Tabela 20. Número total e diferencial de células no foco inflamado. Os resultados expressam o número médio e erro padrão da média, 6 e 24 horas após a inoculação de *A. hydrophila* inativada (G2, G4 e G6) ou injeção de solução salina 0,65% (G1, G3, G5) na bexiga natatória de tilápias *O. niloticus*.

Célula	T	Grupo					
		G1	G2	G3	G4	G5	G6
Células	6h	525±11,19Aa	4000±40,98 Ab	540±9,05 Aa	7599±147,59Ab	1260±12,49 Aa	9150±82,49 Ab
	24h	705,33±2,95Aa	2964±24,21 Ab	1368±31,16Aa	12400±71,8Ab	1780±40,74 Aa	14780,83±114,33Ab
Trombócitos	6h	416,16±0,21Ac	3061±35,17 Aa	410,2±8,33 Bc	4811,98±124,17Aa	847,2±12,62 Bb	6435,91±68,62 Ba
	24h	397,75±26,11Ac	2390,7±50,41Ab	1000,18±25,65Ab	11284±68,2 Bb	1270,3±32,87Ab	13400,74±109,36Aa
Neutrófilos	6h	44,58±2,72 Bc	343,6±13,25Ab	57,2±2,6 Bc	1163,64±56,21 Aa	195 ± 6,05 Ab	1169,91±29,86 Aa
	24h	162,14±14,38 Ac	474,21±12,3Ab	187,69±13,64 Ac	688±18,76 Ba	198,2±14,86 Ac	774,2 ± 25,08 Ba
Linfócito	6h	44,41±2,69 Bc	341,8±12,9 Ab	26±2,88 Bc	712,31±42,91 Ab	121,6±3,05 Bb	7709,08±24,8 Aa
	24h	94,75±10 Ab	231,03±7,77Ab	129,8±10,28 Ab	428±16,34 Ba	214,8±16,23 Ab	605,5 ± 22,23 Ba
Macrófago	6h	7,75±2,16 Ba	209,4±10,5 Ab	41,2±3,42 Ac	692,2±43,8 Aa	102,4±2,77 Ab	671,91 ± 23,75 Aa
	24h	107,6±9,14 Ab	390,14±8,68Aa	50,32 ± 6,35 Ac	0 Bd	96,7 ± 10,35 Ab	0 Bd
Basófilo	6h	12,08±2,74 Ac	44,3±3,57Ab	5,4±0,9 Ac	116,76±12,89 Aa	19,7±1,88 Ac	91,5 ± 8,24 Aa
	24h	0 Ba	0 Ba	0 Aa	0 Ba	0 Ba	0 Ba

Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre colunas e letras minúsculas entre linhas. Teste de Tukey, $p<0,05$.

Tabela 21. Percentual e erro padrão das células inflamatórias encontradas no exsudato, 6 e 24 horas (T) após os estímulos com solução salina (G1, G3 e G5) ou *A. hydrophila* (G2, G4 e G6).

Células	T	Grupos					
		G1	G2	G3	G4	G5	G6
Trombócitos totais	6h	78,6±0,24	77±0,21	75,6±0,44	63,6±0,36	64,8±0,55	71,3±0,23
	24h	54,8±0,73	56,2±0,41	73,4±0,35	73±4,78	74,6 ± 0,5	90,6±0,14
Neutrófilos	6h	9±0,47	8,4±0,46	10,8 ± 0,5	16,2±0,27	15,2±0,66	12,6±0,34
	24h	24±0,82	22,6±0,41	13,6±0,78	4,4±1,37	10,2 ± 0,4	5±0,4
Linfócitos	6h	9 ± 0,55	8,4 ± 0,3	4,6 ± 0,7	10 ± 0,5	10 ± 0,7	7,8±0,61
	24h	9,3±0,33	7,6±0,32	9,2±0,28	2,6±1,03	10±0,89	4,3±0,49
Macrófagos	6h	1,3±0,44	5±0,54	8±1,17	9,2±0,27	8,4±0,52	7,2±0,28
	24h	11,8±0,59	13,6±0,68	3,8±0,66	0	5,2±0,36	0
Basófilos	6h	2,0 ±0,6	1,2 ± 0,4	1 ± 0	1 ± 0	1,6±0,43	1 ± 0,1
	24h	0	0	0	0	0	0

Os valores da série vermelha não diferiram estatisticamente. A variação encontrada na contagem de trombócitos e leucócitos sanguíneos sugerem que a inflamação tenha provocado seu recrutamento dos compartimentos de reserva para o compartimento sanguíneo (Tabela 22).

Tabela 22. Número médio e erro padrão da média do número de leucócitos e trombócitos e da contagem diferencial de leucócitos sanguíneos, 6 e 24 horas após a inoculação de *A. hydrophila* inativada (G2, G4, G6) ou injeção de solução salina 0,65% (G1, G3, G5) em tilápia do Nilo *O. niloticus*.

Células	T	Grupos					
		G1	G2	G3	G4	G5	G6
Leucócitos totais	6h	96134,78 ± 58,78 Aa	60737,65 ± 32,62 Bb	96528,93 ± 110,94 Ba	54610,37 ± 63,75 Bb	82701,29 ± 74,78 Aa	84657,05 ± 130,76 Aa
	24h	77369,13 ± 74,34 Bc	105472,7 ± 111,77 Ab	148486,4 ± 79,04 Aa	71397,15 ± 68,79 Ac	72779,9 ± 72,48 Ac	83446,99 ± 89,21 Ac
Trombócitos	6h	26613,66 ± 37,59 Bb	23637,82 ± 54,45 Bb	30670,56 ± 15,19 Bb	18853,93 ± 49,52 Bc	45739,07 ± 87,24 Ba	47750,32 ± 102,99 Aa
	24h	94149,34 ± 118,77 Ab	36003,35 ± 84,29 Ac	96010,66 ± 75,94 Ab	54425,58 ± 85,62 Ac	170877,7 ± 42,72 Aa	47464,15 ± 112,94 Ac
Neutrófilos	6h	30406,75 ± 49,01 Aa	9619,24 ± 23,67 Bb	5698,74 ± 22,3 Bc	7219,38 ± 35,55 Bb	7215,63 ± 20,46 Bb	28950,53 ± 63,79 Aa
	24h	7574,96 ± 35,09 Bc	23576,78 ± 45,56 Aa	16637,21 ± 44,81 Ab	14324,5 ± 35,26 Ab	16897,48 ± 32,39 Ab	15846,86 ± 40,8 Bb
Linfócito	6h	58379,83 ± 39,81 Ab	47740,5 ± 30,55 Bb	88627,09 ± 107,97 Ba	45275,94 ± 61,46 Ab	74658,15 ± 73,14 Aa	51300,12 ± 117,26 Ab
	24h	6622,1 ± 67,71 Bb	69891,55 ± 115,05 Ab	118910,4 ± 72,55 Aa	50008,93 ± 58,46 Ac	47264,45 ± 56,6 Bc	62747,99 ± 96,29 Ab
Monócitos	6h	7661,18 ± 26,68 Aa	2770,08 ± 13,45 Bc	2073,34 ± 29,15 Bc	2114,67 ± 22,78 Ac	827 ± 7,47 Bd	4405,94 ± 26,58 Ad
	24h	2131,97 ± 26,49 Bc	6441,57 ± 35,37 Aa	4877,08 ± 28,96 Ab	3731,74 ± 19,35 Ab	4796,36 ± 37,84 Ab	5697,3 ± 51,79 Aa
Basófilos	6h	961,32 ± 5,87 Ba	607,32 ± 3,26 Bb	0 Bc	0 Bc	0 Bc	0 Bc
	24h	1440,08 ± 25,31 Ab	1979,89 ± 22,41 Ab	3343,08 ± 29,23 Aa	1561,31 ± 7,06 Ab	1638,19 ± 17,27 Ab	1273,90 ± 24,13 Ab
Células Imaturas	6h	0 Aa	0 Ba	0 Ba	0 Ba	0 Ba	0 Ba
	24h	0 Ad	3473,91 ± 27,13 Ab	4718,63 ± 13,48 Aa	1770,66 ± 13,37 Ac	2183,39 ± 12,55 Ac	2050,34 ± 21,5 Ac

Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre colunas e letras minúsculas entre linhas. Teste de Tukey, $p<0,05$.

A suplementação alimentar proporcionou o aumento da resposta mais intenso, quando somente a parede celular foi utilizada e o principal tipo celular presente no local agredido foi o trombócito, seguido de neutrófilos, linfócitos e macrófagos. A cinética dessas células a partir de seus compartimentos de reserva até alcançar o sítio inflamado parece deixar reflexos nas avaliações do sangue circulante.

A alimentação suplementada nas duas formas empregadas poderia possibilitar maior patamar homeostático favorecendo o desenvolvimento da reação inflamatória. É possível que os peixes assim alimentados disponham de maior fonte de elementos para suprir a demanda imposta pelo fenômeno inflamatório, no que tange à atividade de vasos, células e liberação, síntese ou neoformação de mediadores farmacológicos e moduladores que controlam a reação.

O mecanismo de ação de imunoestimulantes sobre a inflamação (Bricknell & Dalmo, 2005) implica em que elementos do sistema imune apresentem diferentes configurações de receptores de reconhecimento, com variações da resposta de acordo com o tipo de ligação e dos eventos de transmissão dos sinais intracelulares. Todavia, nesse caso, há a necessidade de diferentes tipos de respostas para imunoestimulantes variados.

Peixes que evoluíram na natureza em ambiente silvestre, ao serem confinados em pequenos espaços, estarão acondicionados em locais muito diferentes daquele idealizado pela evolução genética. Assim, é possível que mantenham alta demanda por energia mesmo quando os níveis de cortisol não sejam detectados pelas técnicas disponíveis para sua determinação. Então, ao terem sua dieta suplementada com parede celular de levedura ou levedura autolisada, alcançam maior patamar homeostático, permitindo também o incremento de respostas de defesa.

Os resultados ora apresentados permitem sugerir que a suplementação alimentar com a levedura proporcionou o aumento da resposta celular inflamatória aguda com maior acúmulo de células de defesa no foco lesado. Esse efeito foi mais intenso quando somente a parede celular foi utilizada como suplemento e o principal tipo celular presente no local agredido foi o trombócito, seguido de neutrófilos, linfócitos e macrófagos. É possível que os peixes submetidos à dieta com 0,3% de parede celular de levedura tenham maiores atributos para suprir a demanda imposta pela reação inflamatória no que tange à atividade de vasos, células e liberação, síntese ou neoformação de mediadores farmacológicos que controlam o fenômeno.

Salvador (2008) confirmou esses resultados e avaliou a interferência desse tipo de alimentação suplementada com 0,3% de parede celular de levedura sobre os efeitos da vacinação contra *Streptococcus agalactiae*. Após alimentação dos peixes por 77 dias e vacinação 60 dias depois do início da alimentação, por meio da inoculação intraperitoneal de 0,5 mL da vacina, contendo 10^8 UFC/mL. Após 15 dias da vacinação os peixes foram desafiados com inóculo letal da bactéria.

Os resultados demonstraram que nenhuma ocorrência de mortalidade foi observada nos peixes alimentados com dieta contendo levedura. Nos peixes submetidos à dieta controle, o percentual de mortalidade variou entre 30,0% e 40,0%, sendo maior entre os peixes não vacinados. A suplementação alimentar com a levedura associada à vacinação, induziu maior acúmulo de leucócitos totais, trombócitos e linfócitos no foco

inflamatório. O maior acúmulo de neutrófilos ocorreu nos peixes submetidos à dieta com levedura, enquanto que a de macrófagos, nos peixes vacinados. Os resultados deste trabalho sugerem que a suplementação alimentar com 0,3% de parede celular de levedura associada à vacinação, incrementou resposta de defesa dos peixes, no que se refere à inflamação aguda (Tabela 23).

Tabela 23. Número médio de células totais e percentual médio do número de células no foco inflamado de tilápia do Nilo, alimentadas com dietas suplementadas com 0,3% de parede celular de levedura e vacinadas contra *Streptococcus agalactiae*.

Tratamentos	Variáveis					
	Células Totais	Tromb. (%)	Neutr. (%)	Macr. (%)	Linf. (%)	CGE (%)
Com Levedura	1775,47 a	24,13	1,05	0,45	56,76	17,58
Sem Levedura	778,03 b	21,01	2,53	1,27	64,08	11,08
Com Vacina	1517,64 a	22,88	1,25	1,04	57,73	17,07
Sem Vacina	1243,19 b	22,89	2,00	0,53	61,54	13,01
6 horas	1648,34 a	22,94	2,49	0,86	61,48	12,21
24 horas	1389,26 b	23,59	1,16	0,14	66,89	11,18
48 horas	1103,75 c	25,03	1,29	1,32	51,07	21,28
F para:						
Levedura (L)	407,37 *	0,44 ns	2,01 ns	2,01 ns	1,95 ns	1,82 ns
Vacina (V)	32,10 *	0,00 ns	0,54 ns	0,80 ns	0,55 ns	0,74 ns
Tempo (T)	42,52 *	0,31 ns	0,67 ns	1,46 ns	3,31ns	1,87 ns
L X V	5,45 *	4,04 *	6,09 *	2,12 *	1,84 *	0,60 ns
L X T	39,14 *	1,26 ns	3,10 *	0,17 ns	4,02 *	1,33 ns
V X T	5,71 *	2,06 ns	1,54 ns	2,46 *	5,69 *	0,68 ns
L X V X T	23,34 ns	0,33 ns	0,17 ns	0,55 ns	0,34 ns	0,88 ns
CV	14,7	74,36	61,2	85,77	35,95	131,9

Para cada variável aferida, em cada fator de variação, médias seguidas de letras distintas diferem entre si, $p<0{,}05$. *diferença significativa; ns: diferença não significativa.

Após o desafio com o *S. agalactiae* nenhuma ocorrência de mortalidade foi observada nos peixes alimentados com dietas suplementadas, com porcentagem de sobrevivência relativa de 100% (PSR 100%), independente do efeito de vacinação. Entre os submetidos à dieta controle, a mortalidade dos vacinados foi de 28,57% e a dos não vacinados foi de 38,09%, correspondendo à PSR de 25%. De todos os peixes que vieram a óbito, foi possível o isolamento de *S. agalactiae* a partir de rim e encéfalo.

A baixa porcentagem de sobrevivência relativa (PSR) observada entre os peixes que receberam dieta controle (25%), em comparação aos peixes submetidos à suplementação dietética (100%), sugere eficácia adequada da vacina na proteção dos peixes, quando associada com a suplementação dietética com parede celular de levedura.

A suplementação dietética com levedura possivelmente permita que os peixes cheguem a um maior patamar homeostático que possibilite suprir a demanda imposta pelas reações de defesa. Trutas arco-íris alimentadas com ração suplementada com 0,1% de glucano, um constituinte da parede celular de *S. cereviasiae* e submetidas ao estresse de transporte apresentaram concentrações de cortisol mais baixas que o observado no grupo controle. Essa menor taxa de cortisol plasmático favoreceu a fagocitose, o surto respiratório de leucócitos e a resistência à infecção por *Falvobacterium columnaris* (Jeney et al., 1997). Então é possível que suplementação dietética com esses elementos possa favorecer a homeostase orgânica dos peixes favorecendo, facilitando suas respostas fisiopatológicas.

A suplementação alimentar com ácidos graxos essenciais na inflamação crônica por corpo estranho

Os lipídios e os ácidos graxos essenciais estão envolvidos nas funções energéticas e fisiológicas de peixes (Henderson & Tocher, 1987; Sargent et al., 1989; Tocher, 2003). Os peixes de água doce necessitam de ácido linoléico (n-6) e ácido linolênico (n-3) na dieta (Pezzato et al., 2004). Quando deficientes apresentam aumento da conversão alimentar, da taxa de mortalidade, da presença de líquido nos músculos, da taxa respiratória e diminuição do crescimento, dos níveis de hemoglobina do número de eritrócitos e surgem ulcerações nas nadadeiras e esteatose hepática (Mabília, 2005). Há indicações de redução na produção de anticorpos, da atividade fagocitária de macrófagos (Kiron et al., 1995) e do sistema complemento (Tort et al., 1996; Monteiro et al., 1998).

Sua participação nas respostas de defesa é atribuída à produção de eicosanoides com atividade pró-inflamatória a partir do ácido araquidônico monoesterificado (AA), ácido eicosapentanoico (EPA), ácido docosahexanoico (DHA) e ácido graxo poli-insaturado, 20:3n-6 (Lim et al., 2005) que mantém a integridade de membranas e de seus receptores (Balfry & Higgs, 2001).

Peixes alimentados com dietas ricas em n-3 e n-6 apresentam aumento da resposta de linfócitos B e da sobrevivência ao desafio com *Aeromonas salmonicida* e *Vibrio anguillarum* (Thompson et al., 1996) e títulos mais altos de anticorpos frente à imunização contra *Edwardsiella ictaluri* (Fracalossi & Lovell, 1994).

Com base nesses fatos, Sakabe (2007) realizou este ensaio para avaliar a resposta inflamatória crônica do tipo corpo estranho e o desempenho produtivo em tilápias do Nilo jovens alimentadas com ração suplementada com ácidos graxos essenciais.

Os peixes receberam dietas-teste contendo os ácidos graxos essenciais durante 90 dias para avaliação do desempenho produtivo. Em seguida, foram submetidos ao implante de lamínula de vidro no tecido subcutâneo e a inflamação crônica foi avaliada pela quantificação do acúmulo de macrófagos,

formação de células policariontes com a quantificação de seus núcleos e dos tipos de gigantócitos.

O óleo de soja degomado (OS) foi utilizado como fonte de n-6 e o óleo de linhaça (OL) para fornecer n-3 (Tabela 24), em cinco tratamentos com quatro repetições. O fornecimento das dietas-teste foi iniciado 90 dias antes do implante das lamínulas de vidro.

Amostras das rações foram analisadas por cromatografia gasosa–14B–Shimadzu e os resultados estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 24. Distribuição dos peixes nos diferentes tratamentos.

Grupo (Número de peixes)	Sacrifício pós-implante			
	2 dias	4 dias	6 dias	8 dias
T1 = 100% OS 0% OL (n=40)	N=7	N=7	N=7	N=7
T2 = 75% OS+ 25% OL (n=40)	N=7	N=7	N=7	N=7
T3 = 50% OS + 50% OL (n=40)	N=7	N=7	N=7	N=7
T4 = 25% OS + 75% OL (n=40)	N=7	N=7	N=7	N=7
T5 = 0% OS + 100% OL (n=40)	N=7	N=7	N=7	N=7

Tabela 25. Perfil de ácidos graxos das dietas obtidas pela análise cromatográfica a gás GC- 14B –Shimadzu.

	Tratamentos[1]				
	T1	T2	T3	T4	T5
C14:0 (Ác. Mirístico)	0,59	0,47	0,49	0,93	0,87
C16:0 (Ác. Palmítico)	14,15	15,28	15,74	17,32	18,38
C16:1 (Ác. Palmitoleico)	1,12	1,29	1,88	2,95	3,74
C17:0 (Ác. Heptadenóico)	0,18	0,14	0,14	0,2	0,19
C18:0 (Ác. Esteárico)	3,17	3,14	3,52	3,63	4,1
C18:1n9c (Ác. Oléico)	24,14	25,35	27,53	29,1	31,21
C18:2n6c (Ác. a - Linoleico)	47,65	37,3	21,36	12,64	3,92
C18:3n3 (Ác. Linolênico)	5,18	14,24	26,4	28,79	33,67
C20:1n9c (Ác. Eicosenóico)	0,34	0,28	0,3	0,36	0,34
C20:5n3 (Ác. Eicosapentaenóico)	0,56	0,19	0,2	0,67	0,45
C22:6n3 (Ác. Docosahexaenóico)	0,81	0,29	0,32	1,01	0,69
NI - Não identificados	2,11	2,03	2,12	2,4	2,44
	100	100	100	100	100

(1) T1 - 100% óleo de soja degomado(OS), T2 - 75%OS + 25% de óleo de linhaça (OL), T3 - 50% OS + 50% OL, T4 - 25% OS + 75% OL, T5 - 100% OL

A avaliação da resposta inflamatória crônica por corpo estranho em tilápias do Nilo alimentadas com ração suplementada com ácidos graxos essenciais está expressa nas Tabelas 26-27. Pela análise dessas, verifica-se que os resultados estão de acordo com os observados anteriormente por Petric et al. (2003 a,b), Brum (2003), Belo et al.(2005), quanto ao acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos policariontes.

A suplementação com ácidos graxos essenciais na dieta para a tilápia do Nilo incrementou o acúmulo e a dinâmica de macrófagos no foco inflamado. Na literatura que foi possível compilar não se encontrou referências sobre a relação entre ácidos graxos e a resposta inflamatória crônica por corpo estranho em peixes. Porém há evidências da interferência de ácidos graxos na resistência às doenças (Balfry & Higgs, 2001; Gatlin, 2002).

Os ácidos graxos da dieta podem favorecer a defesa do organismo, pelo menos em parte, por auxiliarem na manutenção da integridade da composição lipídica de membranas e de seus receptores em macrófagos, da qual são dependentes as interações com sinalizadores químicos da resposta inflamatória (Balfry & Higgs, 2001). A manutenção da integridade das membranas celulares é atribuída à produção de eicosanoides com atividade pró-inflamatória a partir do ácido araquidônico monoesterificado (AA), ácido eicosapentanoico (EPA), ácido docosahexanoico (DHA) e ácido graxo poli-insaturado, 20:3n-6 (Lim et al., 2005).

Neste ensaio, o incremento da resposta de macrófagos foi semelhante ao verificado por Belo et al. (2005) mediante a suplementação alimentar com vitamina E. Em ambos os casos, as substâncias utilizadas como suplemento alimentar atuam como antioxidantes de membranas biológicas. A deficiência de vitamina E associada ou não à deficiência de ácidos graxos insaturados está relacionada ao aumento da peroxidação lipídica (Blazer & Wolke, 1983; Moccia et al., 1984; Wada et al., 1989, 1991). Então o incremento da resposta dos macrófagos pode ser explicado, pelo menos em parte, por tais propriedades, que por manterem melhor a integridade da membrana celular facilitaria a ligação de mediadores químicos a seus receptores na superfície celular.

Portanto, esses resultados sugerem que a suplementação alimentar com ácidos graxos essenciais para O. niloticus exerce ações benéficas no organismo, favorecendo o acúmulo localizado de macrófagos e a formação de células policariontes na inflamação crônica por corpo estranho. Então essa suplementação alimentar pode ser útil na prevenção de enfermidades por favorecer a resposta de defesa celular do hospedeiro.

Tabela 26. Valores médios[1] transformados em log (x + 1), erro padrão e o resultado da análise de variância[2] das contagens de células nas lamínulas dois e quatro dias após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, submetidas aos diferentes tratamentos com ácidos graxos na dieta.

Tratamentos		Número de núcleos						
		1	2	3 a 5	6 a 10	11 a 20	>20	Cel. Lang.[4]
Dia 02	100% OS	$2,16^{ABa}$ (0,08)	$0,75^{ABa}$ (0,08)	$0,11^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,06)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,05)
	75%OS+ 25%OL	$2,11^{ABa}$ (0,08)	$0,84^{ABa}$ (0,08)	$0,08^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,06)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,05)
	50%OS+ 50%OL	$2,04^{Aa}$ (0,08)	$0,53^{Aa}$ (0,08)	$0,14^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,06)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,05)
	25%OS+ 75%OL	$2,38^{Ba}$ (0,08)	$0,97^{Ba}$ (0,08)	$0,25^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,06)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,05)
	100% OL	$2,28^{ABa}$ (0,08)	$0,81^{ABa}$ (0,08)	$0,28^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,06)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,05)
Valor de F		3,290	4,043	1,548	0,000	0,000	0,000	0,000
Pr > F[4]		0,0134	0,0041	0,1922	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Dia 04	100% OS	$3,01^{Ab}$ (0,08)	$1,73^{Ab}$ (0,08)	$1,00^{Ab}$ (0,07)	$0,14^{Aa}$ (0,06)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,05)
	75%OS+ 25%OL	$3,09^{Ab}$ (0,08)	$1,74^{Ab}$ (0,08)	$1,02^{Ab}$ (0,07)	$0,25^{ABb}$ (0,06)	$0,04^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,05)
	50%OS+ 50%OL	$3,08^{Ac}$ (0,08)	$1,98^{Ab}$ (0,08)	$1,33^{Bb}$ (0,07)	$0,60^{Cb}$ (0,06)	$0,18^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,05)
	25%OS+ 75%OL	$3,06^{Ab}$ (0,08)	$1,95^{Ab}$ (0,08)	$1,17^{ABb}$ (0,07)	$0,43^{BCb}$ (0,06)	$0,04^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,05)
	100% OL	$3,09^{Ab}$ (0,08)	$1,76^{Ab}$ (0,08)	$0,98^{Ab}$ (0,07)	$0,34^{ABb}$ (0,06)	$0,09^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,05)
Valor de F		0,210	2,314	4,499	8,283	1,009	0,000	0,000
Pr > F[4]		0,9326	0,0612	0,0020	0,0000	0,4051	1,0000	1,0000

(1) Média aritmética de 175 contagens por dia (5 tratamentos x 7 animais por tratamento x 5 campos por animal), comparados nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05). (2) Análise de variância esta representada por letras maiúsculas para comparação dos tratamentos dentro de cada dia estudado e letras minúsculas para comparação entre os diferentes dias estudados. (3) Células de Langhans. (4) Pr>F - Probabilidade de significância de F.

Tabela 27. Valores médios[1] transformados em log (x + 1), erro padrão e análise de variância[2] das contagens de células nas lamínulas nos seis e oito dias após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, nos diferentes tratamentos.

Tratamentos[3]		Número de núcleos						
		1	2	3 a 5	6 a 10	11 a 20	>20	Cel.[3] Langhans
Dia 06	100% OS	2,99^{Ab} (0,08)	1,95^{Ab} (0,08)	1,54^{Ac} (0,07)	1,18^{Ab} (0,06)	0,69^{Ab} (0,07)	0,53^{Ab} (0,07)	0,14^{Aa} (0,05)
	75%OS+ 25%OL	3,03^{Ab} (0,08)	2,02^{Ab} (0,08)	1,54^{Ac} (0,07)	1,07^{Ac} (0,06)	0,72^{Ab} (0,07)	0,27^{Ab} (0,07)	0,04^{Aa} (0,05)
	50%OS+ 50%OL	3,03^{Abc} (0,08)	2,01^{Ab} (0,08)	1,62^{Ac} (0,07)	1,16^{Ac} (0,06)	0,90^{Ac} (0,07)	0,43^{Ab} (0,07)	0,04^{Aa} (0,05)
	25%OS+ 75%OL	3,04^{Ab} (0,08)	1,90^{Ab} (0,08)	1,49^{Ac} (0,07)	1,10^{Ac} (0,06)	0,78^{Ab} (0,07)	0,29^{Ab} (0,07)	0,09^{Aa} (0,05)
	100% OL	2,89^{Ab} (0,08)	1,95^{Ab} (0,08)	1,47^{Ac} (0,07)	1,07^{Ac} (0,06)	0,84^{Ab} (0,07)	0,52^{Ab} (0,07)	0,48^{Bb} (0,05)
Valor de F		0,681	0,384	0,637	0,674	1,585	2,122	14,481
Pr > F[4]		0,6058	0,8196	0,6368	0,6110	0,1823	0,0818	0,0000
Dia 08	100% OS	2,86^{Ab} (0,08)	1,85^{Ab} (0,08)	1,43^{Ac} (0,07)	1,03^{Ab} (0,06)	0,67^{ABb} (0,07)	0,60^{ABb} (0,07)	0,45^{ABb} (0,05)
	75%OS+ 25%OL	2,95^{Ab} (0,08)	1,85^{Ab} (0,08)	1,41^{Ac} (0,07)	1,05^{Ac} (0,06)	0,91^{Bb} (0,07)	0,76^{Cc} (0,07)	0,38^{Ab} (0,05)
	50%OS+ 50%OL	2,78^{Ab} (0,08)	1,82^{Ab} (0,08)	1,38^{Abc} (0,07)	0,93^{Ac} (0,06)	0,62^{Ab} (0,07)	0,48^{Ab} (0,07)	0,62^{BCb} (0,05)
	25%OS+ 75%OL	2,81^{Ab} (0,08)	1,87^{Ab} (0,08)	1,35^{Abc} (0,07)	0,94^{Ac} (0,06)	0,69^{ABb} (0,07)	0,63^{ABc} (0,07)	0,69^{Cb} (0,05)
	100% OL	2,91^{Ab} (0,08)	1,87^{Ab} (0,08)	1,43^{Ac} (0,07)	1,06^{Ac} (0,06)	0,88^{ABb} (0,07)	0,62^{ABb} (0,07)	0,73^{Cc} (0,05)
Valor de F		0,854	0,073	0,233	1,023	3,842	3,199	10,257
Pr > F		0,4935	0,9903	0,9192	0,3976	0,0056	0,0154	0,0000

[1)] Média aritmética de 175 contagens em cada tempo (5 tratamentos x 7 animais por tratamento x 5 campos por animal), comparados nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05). [(2)] Análise de variância: letras maiúsculas para comparação dentro de cada tempo; letras minúsculas comparação entre tempos. [(3)] Células de Langhans

O cromo trivalente e a inflamação aguda induzida por *Aeromonas hydrophila* e tioglicolato

Na vigência da inflamação aguda em ratos Wistar, a insulina e os corticosteroides adrenais exercem efeitos fisiologicamente antagônicos, sendo o primeiro de ação pró-inflamatória, enquanto o segundo exerce ação anti-inflamatória (Moraes & Garcia-Leme, 1982; Moraes et al., 1987). Duas horas após a estimulação com carragenina, os níveis de corticosterona endógena mais que dobram seus valores plasmáticos para inibir e controlar o desenvolvimento da reação. Quando 2UI de insulina são ministradas no

momento da aplicação da carragenina, sua maior concentração facilita o desenvolvimento da reação, pois ela não é inibida pelo aumento da concentração plasmática dos costicosteroides endógenos e as respostas permanecem equivalentes até a quarta hora (Moraes & Garcia-Leme, 1982).

O cromo trivalente age potencializando a ação da insulina (Mowat, 1997) e reduzindo a concentração plasmática de cortisol em situações estressantes (Wedemeyer, 1997). Para Guerrero-Romero & Rodríguez-Morán (2005), o cromo trivalente é essencial para a manutenção dos níveis normais de glicose e para o metabolismo dos lipídios, potencializando a ação da insulina, ativando tirosina cinase e inibindo a fosfotirosina fosfatase, exercendo ainda, forte ação antioxidante celular e diminuindo a extração hepática de insulina.

Em pacus *P. mesopotamicus* alimentados com dieta suplementada com diferentes concentrações de carboquelato de cromo, não se observou diferença significativa quanto aos índices zootécnicos, porém os parâmetros fisiológicos apontaram menor concentração de cortisol plasmático nos pacus alimentados com dieta suplementada, sugerindo efeito antiestressante (Fujimoto et al., 2005).

Devido a esse efeito como potencializador da ação da insulina e antiestressante pela redução da concentração plasmática de cortisol, quando utilizado como suplemento dietético poderia potencializar a resposta inflamatória.

Com base nessas considerações o presente ensaio teve como objetivo avaliar a cinética do componente celular inflamatório induzido por tioglicolato e *A. hydrophila* inativada na bexiga natatória de pacus, alimentados com dieta suplementada com carboquelato de cromo.

Carboquelato de cromo foi incorporado à ração basal (28% de PB e 4.100 kcal), que foi peletizada, embalada e estocada a 18°C negativos. Amostras de 50g de cada dieta foram colhidas para determinação das concentrações de carboquelato de cromo por espectrofotometria de indução de plasma (ICP-OES; marca GBC INTEGRA XM). Os resultados estão apresentados na Tabela 29.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em parcelas subdivididas sendo quatro níveis de carboquelato de cromo 0, 12, 18 e 36 mg/kg na dieta, três estímulos inflamatórios sendo 0,5 mL de solução de cloreto de sódio estéril a 0,65% (controle), 0,5 mL de tioglicolato a 6% em salina e $3x10^9$ unidades formadoras de colônia (UFC) de *A. hydrophila*) com duas repetições. A inflamação foi avaliada pela contagem total e diferencial das células presentes no foco inflamado 6, 24 e 48 horas após as aplicações.

Os resultados demonstraram aumento gradativo do número de células totais acumuladas para os dois estímulos. Nos peixes que receberam ração contendo 18 mg/kg de carboquelato de cromo observou-se incremento da reação inflamatória com acúmulo de trombócitos, linfócitos e macrófagos no grupo inoculado com *A. Hydrophila*. Nos peixes injetados com tioglicolato predominaram os linfócitos e trombócitos. Após 48 horas ocorreu maior acúmulo de células com ambos os estímulos, demonstrando o efeito benéfico do cromo facilitando o desenvolvimento da inflamação. O acúmulo de células granulocíticas especiais (CGE), neutrófilos e eosinófilos foi pouco expressivo (Tabelas 28-31).

Tabela 28. Valores médios, erro padrão e análise de variância expressos em log^{-1} do número de células totais (LT) acumuladas no foco inflamado de pacus *P. mesopotamicus* com dieta não suplementada ou suplementada com 12, 18 e 36mg/kg de carboquelato de cromo, 6, 24 e 48 horas, após a indução do processo inflamatório induzido com solução salina (S), tioglicolato (T) e *A. hydrophila* inativada (B).

LT		Níveis de Cromo			
		Não suplementado	**12mg**	**18mg**	**36mg**
6 horas	**S**	2,6 Aa (0,13)	2,4 Aa (0,13)	2,1 Aa (0,13)	1,9 Aa (0,13)
	B	3,4 Aa (0,15)	3,1 Aa (0,15)	3,1 Ba (0,15)	3,1 Ba (0,15)
	T	2,6 Aa(0,15)	2,7 Aa (0,15)	2,8 Aab (0,15)	2,3 Aab (0,15)
Valores F		2,959	1,837	3,962	5,896
Pr>F		0,0599	0,1673	0,0248	0,0049
24 horas	**S**	2,7 Aa (0,12)	2,8 Aa (0,12)	2,3 Aa (0,12)	2,5 Aa (0,12)
	B	3,0 Aab (0,19)	3,0 Aa (0,19)	2,6 Aa (0,19)	2,6 Aab (0,19)
	T	3,5 Ba (0,19)	2,9 Aa (0,19)	3,3 aB (0,19)	3,2 Ba (0,19)
Valores F		3,940	0,324	6,317	3,573
Pr>F		0,0253	0,7232	0,0035	0,0347
48 horas	**S**	2,6 Aa (0,16)	2,7 Aa (0,16)	2,0 Aa (0,16)	2,6 Aa (0,16)
	B	3,2 Aa (0,19)	2,8 Aa (0,19)	2,7 ABa (0,19)	2,7 Aa (0,19)
	T	2,4 Aa (0,33)	3,1 Aa (0,33)	3,3 Ba (0,33)	2,8 Aa (0,33)
Valores F		1,731	0,383	4,242	0,148
Pr>F		0,1847	0,6821	0,0195	0,8632

Médias aritméticas de 180 pacus por mês (12 tratamentos x 5 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$). Análise de variância está representada por letras maiúsculas para colunas na comparação das substâncias aplicadas dentro de cada período estudado e letras minúsculas para linhas na comparação entre os diferentes tratamentos. Pr>F – Probabilidade de significância de F.

Tabela 29. Valores médios, erro padrão e análise de variância expressos em $\log^{-1}$ do número de trombócitos acumulados no foco inflamado de pacus *P. mesopotamicus* com dieta não suplementada ou suplementada com 12, 18 e 36mg/kg de carboquelato de cromo, 6, 24 e 48 horas, após a indução do processo inflamatório induzido com solução salina (S), tioglicolato (T) e *A. hydrophila* inativada (B).

Trombócitos		Níveis de Cromo			
		Não suplementado	**12mg**	**18mg**	**36mg**
6 horas	**S**	0,2 Aa (0,05)	1,2 Aa (0,05)	0,4 Aa (0,05)	1,0 Aa (0,05)
	B	0,4 Aa (0,06)	0,6 Aa (0,06)	1,0 Bab (0,06)	5,8 Bb (0,06)
	T	2,4 Aa(0,11)	2,8 Aa (0,11)	2,8 ABa (0,11)	0,8 Aa (0,11)
Valores F		1,350	0,931	3,383	4,812
Pr>F		0,2650	0,3971	0,0411	0,0120
24 horas	**S**	0,8 Aa (0,05)	1,0 Aa (0,05)	1,0 Aa (0,05)	1,0 Aa (0,05)
	B	1,6 Aa (0,06)	2,2 Aa (0,06)	4,6 Ba (0,06)	2,0 Aa (0,06)
	T	7,6 Bb (0,11)	0,4 Aa (0,11)	2,2 ABa (0,11)	16,2 Bb (0,11)
Valores F		0,296	1,567	4,121	3,319
Pr>F		0,0002	0,2156	0,0216	0,0000
48 horas	**S**	3,2 Aa (0,05)	0,6 Aa (0,05)	0,8 Aa (0,05)	1,2 Aa (0,05)
	B	2,8 Aa (0,06)	2,0 Aa (0,06)	1,2 Aa (0,06)	4,0 Aa (0,06)
	T	2,0 Aa (0,11)	0,6 Aa (0,11)	2,4 Aa (0,11)	3,0 Aa (0,11)
Valores F		0,196	1,526	1,259	2,078
Pr>F		0,8230	0,2242	0,2893	0,1336

Médias aritméticas de 180 pacus por mês (12 tratamentos x 5 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey, p>0,05. Análise de variância está representada por letras maiúsculas para colunas na comparação das substâncias aplicadas dentro de cada período estudado e letras minúsculas para linhas na comparação entre os diferentes tratamentos. Pr>F – Probabilidade de significância de F.

Tabela 30. Valores médios, erro padrão e análise de variância expressos em log^{-1} do número de linfócitos presentes no foco inflamado de pacus *P. mesopotamicus* com dieta não suplementada ou suplementada com 12, 18 e 36mg/kg de carboquelato de cromo, 6, 24 e 48 horas após, a indução do processo inflamatório com solução salina (S), tioglicolato (T) e *A. hydrophila* inativada (B).

Linfócitos		Níveis de Cromo			
		Não suplementado	**12mg**	**18mg**	**36mg**
6 horas	**S**	3,2 Aa (0,08)	9,2 Aa (0,08)	1,0 Aa (0,08)	2,8 Aa (0,08)
	B	3,2 Aa (0,09)	4,4 Aa (0,09)	0,8 Aa (0,09)	1,2 Aa (0,09)
	T	16,0 Aa (0,09)	8,4 Aab (0,09)	0,2 Ab (0,09)	0,2 Ab (0,09)
Valores F		0,687	0,620	0,197	1,149
Pr>F		0,5042	0,5391	0,8218	0,3217
24 horas	**S**	0,6 Aa (0,06)	0,6 Aa (0,06)	0,4 Aa (0,06)	1,6 Aab (0,06)
	B	0,2 Aa (0,05)	1,2 Aa (0,05)	5,8 Bb (0,05)	0,6 Aa (0,05)
	T	2,8 Ba (0,06)	0,8 Aa (0,06)	2,2 Ba (0,06)	4,6 Ba (0,06)
Valores F		6,063	0,541	8,151	4,914
Pr>F		0,0043	0,5826	0,0009	0,0111
48 horas	**S**	3,6 Aa (0,08)	0,6 Aa (0,08)	0,4 Aa (0,08)	3,6 Aa (0,08)
	B	3,0 Aa (0,07)	3,6 Aa (0,07)	0,8 Aab (0,07)	9,0 Aa (0,07)
	T	1,4 Aa (0,07)	1,2 Aa (0,07)	6,2 Ba (0,07)	1,4 Aa (0,07)
Valores F		1,193	1,237	4,202	0,723
Pr>F		0,3083	0,2955	0,0202	0,4868

Médias aritméticas de 180 pacus por mês (12 tratamentos x 5 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey, p>0,05. Análise de variância está representada por letras maiúsculas para colunas na comparação das substâncias aplicadas dentro de cada período estudado e letras minúsculas para linhas na comparação entre os diferentes tratamentos. Pr>F – Probabilidade de significância de F.

Tabela 31. Valores médios, erro padrão e análise de variância expressos em $\log^{-1}$ do número de macrófagos no foco inflamado de pacus *P. mesopotamicus* com dieta não suplementada ou suplementada com 12, 18 e 36mg/kg de carboquelato de cromo, 6, 24 e 48 horas, após a indução do processo inflamatório induzido com solução salina (S), tioglicolato (T) e *A. hydrophila* inativada (B).

Macrófagos		Níveis de Cromo			
		Não suplementado	12mg	18mg	36mg
6 horas	S	0,0 Aa (0,02)	0,4 Aa (0,02)	0,0 Aa (0,02)	0,0 Aa (0,02)
	B	0,4 Aa (0,03)	0,0 Aa (0,03)	0,2 Aa (0,03)	0,4 Aa (0,03)
	T	0,6 Aa(0,05)	0,4 Aa (0,05)	0,0 Aa (0,05)	0,0 Aa (0,05)
Valores F		0,000	4,000	0,000	0,000
Pr>F		10,000	0,0240	10,000	10,000
24 horas	S	0,2 Aa (0,05)	0,2 Aa (0,05)	0,0 Aa (0,05)	0,2 Aa (0,05)
	B	0,0 Aa (0,06)	0,0 Aa (0,06)	0,0 Aa (0,06)	0,2 Aa (0,06)
	T	0,6 Ab (0,11)	0,0 Aa (0,11)	0,4 Ab (0,11)	4,4 Bb (0,11)
Valores F		3,355	0,204	0,816	17,558
Pr>F		0,0421	0,8162	0,4443	0,0000
48 horas	S	0,2 ABa (0,03)	0,0 Aa (0,03)	0,2 ABa (0,03)	0,2 Aa (0,03)
	B	1,2 Bb (0,06)	0,0 Aa (0,06)	0,0 Aa (0,06)	0,2 Aab (0,06)
	T	0,0 Aa (0,06)	0,0 Aa (0,06)	0,8 Ba (0,06)	0,2 Aa (0,06)
Valores F		6,000	0,000	0,667	0,667
Pr>F		0,0045	10,000	0,5146	0,5146

Médias aritméticas de 180 pacus por mês (12 tratamentos x 5 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p>0,05$. Análise de variância está representada por letras maiúsculas para colunas na comparação das substâncias aplicadas dentro de cada período estudado e letras minúsculas para linhas na comparação entre os diferentes tratamentos. Pr>F – Probabilidade de significância de F.

Após seis horas os peixes que receberam diferentes níveis de carboquelato de cromo apresentaram menores níveis glicêmicos, sendo o tratamento de 12 mg/kg de cromo no grupo injetado com salina (GS) e o tratamento de 18 mg/kg no grupo inoculado com a bactéria (GB) e no grupo injetado com tioglicolato (GT) mais efetivos nesse intervalo. O grupo controle demonstrou maior concentração de glicose diferindo dos que receberam carboquelato de cromo no GS e GT. Após 24 horas, observou-se maior glicemia no GS, diferindo dos demais que receberam cromo. Após 48 horas apenas o GB apresentou redução das médias dos que receberam cromo diferindo do controle. Na análise dos tempos entre os tratamentos, verifica-se que ocorreu interação do cromo na redução da glicemia demonstrando a potencialização sobre a ação da insulina (Tabela 32).

Tabela 32. Valores médios, erro padrão e análise de variância da glicemia de pacus *P. mesopotamicus* com dieta não suplementada ou suplementada com 12, 18 e 36mg/kg de carboquelato de cromo, 6, 24 e 48 horas após a indução do processo inflamatório.

Glicemia		Níveis de Cromo			
		Não suplementado	12mg	18mg	36mg
6 horas	S	86 ABb (3,30)	58 Aa (3,30)	60 Aa (3,30)	76 Aab (3,30)
	B	69 Aab (3,82)	62 Aa (3,82)	61 Aa (3,82)	69 Aa (3,82)
	T	99 Bb (6,61)	58 Aa (6,61)	52 Aa (6,61)	71 Aa (6,61)
Valores F		5,366	0,114	0,481	0,337
Pr>F		0,0076	0,8941	0,6187	0,7140
24 horas	S	81 Ab (3,35)	68 Ab (3,35)	56 Aa (3,35)	67 Aab (3,35)
	B	73 Aa (3,87)	65 Aa (3,87)	64 Aa (3,87)	59 Aa (3,87)
	T	74 Aa (6,70)	66 Aa (6,70)	54 Aa (6,70)	67 Aa (6,70)
Valores F		0,442	0,057	0,605	0,512
Pr>F		0,6431	0,9461	0,5472	0,5997
48 horas	S	58 Aa (3,76)	77 Aa (3,76)	81 Aa (3,76)	60 Aa (3,76)
	B	86 Bb (4,35)	58 Aab (4,35)	69 Aab (4,35)	57 Aa (4,35)
	T	72 ABa (7,53)	63 Aa (7,53)	75 Aa (7,53)	65 Aa (7,53)
Valores F		3,552	1,615	0,593	0,244
Pr>F		0,0354	0,2061	0,5533	0,7841

Médias aritméticas de 180 pacus por mês (12 tratamentos x 5 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey, p>0,05. Análise de variância está representada por letras maiúsculas para colunas na comparação das substâncias aplicadas dentro de cada período estudado e letras minúsculas para linhas na comparação entre os diferentes tratamentos. Pr>F – Probabilidade de significância de F.

Comparando o desenvolvimento da reação inflamatória entre os diferentes agentes flogógenos aplicados em peixes não suplementados observa-se que no grupo inoculado com *A. hydrophila* inativada ocorreu maior acúmulo de células totais em todos os tempos de observação se comparado ao grupo injetado com salina. Essa resposta foi aguda e máxima após seis horas e manteve-se até 48 horas. Por outro lado nos que receberam tioglicolato como estímulo lesivo a resposta foi mais tardia, sendo máxima após 24 horas, sempre em relação ao grupo injetado com salina. Após 48 horas a reação era drasticamente menor. Essa diferença observada quanto à precocidade da resposta possivelmente esteja relacionada ao tipo de agente injuriante.

Segundo Hill & Rowley (1996) os trombócitos de peixes possuem funções de defesa expressa pela fagocitose e hemostasia graças aos mecanismos de agregação, contribuindo para manter o hospedeiro livre de micro-organismos após dano vascular. Estudos *in vitro* demonstram que

Staphylococcus aureus foram fagocitados por trombócitos do exsudato peritoneal de *Cyprinus carpio* (Suzuki, 1986), o mesmo ocorrendo com *Edwardsiella tarda* em *Anguilla japonica* (Kusuda & Ikeda, 1987).

Os peixes inoculados com *A. hydrophila* que receberam 18 mg de carboquelato de cromo/kg apresentaram incremento da reação inflamatória em comparação aos grupos que não receberam suplementação ou que receberam outras concentrações, após 48 horas. Apesar desse incremento, os tipos celulares predominantes não sofreram alterações qualitativas.

Quando o tioglicolato foi usado como estímulo lesivo nos peixes que receberam dieta suplementada com 18 mg de carboquelato de cromo/kg de ração, também houve incremento da reação, com as mesmas características anteriores após 24 e 48 horas. Do mesmo modo, os que não foram suplementados ou que receberam outros níveis de cromo não apresentaram o mesmo fenômeno.

O cromo trivalente, entre outras ações, diminui a deposição de gordura e aumenta a deposição de proteína em pacus *P. mesopotamicus* (Fujimoto et al., 2007). Esse efeito decorre da sua ação como agente potencializador da ação da insulina, constituindo-se em um fator de tolerância à glicose (Mowat, 1997), que facilita a união da insulina com seu receptor presente na superfície celular, aumentando a sensibilidade da célula à glicose (Mertz & Roginski, 1969).

Na inflamação aguda induzida pela carragenina em ratos Wistar a insulina e os corticosteroides adrenais exercem efeitos fisiológicos antagônicos. Na fase inicial da reação as propriedades da insulina providenciam glicose como fonte de energia necessária para o desenvolvimento dos diferentes eventos que a compõe. Após duas horas, por ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, ocorre a liberação de corticosteroides adrenais no sentido de controlar e limitar o desenvolvimento do fenômeno inflamatório. Assim, esses hormônios exercem efeitos fisiologicamente antagônicos (Moraes & Garcia Leme, 1982; Moraes et al., 1987). Então o cromo trivalente, enquanto agente potenciador da ação da insulina e fator de tolerância à glicose poderia, no contexto da presente observação, agir no mesmo sentido. Ou seja, providenciar maior disponibilidade de glicose e favorecer o desenvolvimento dos eventos pró-inflamatórios da resposta à *A. hydrophila* e ao tioglicolato.

Em apoio a essa hipótese, verifica-se que os peixes suplementados com cromo trivalente, em quaisquer dos níveis utilizados, apresentaram redução dos níveis glicêmicos. Esses resultados corroboram as observações de Anderson (1994), que verificou redução da glicemia em humanos suplementados com óxido de cromo. Além disso, a suplementação da dieta com esse microelemento tende a reduzir os efeitos nocivos do estresse em espécies domésticas por diminuir os níveis circulantes de cortisol (Mowat, 1997).

Então, no presente ensaio, o cromo trivalente poderia, além de prover maior disponibilidade de energia para o desenvolvimento dos eventos inflamatórios, agir na redução dos níveis circulantes de cortisol, facilitando ainda mais o desenvolvimento da inflamação, como demonstrado por Fujimoto et al. (2005).

No caso deste ensaio o mecanismo pelo qual o cromo trivalente pode incrementar a resposta inflamatória aponta no sentido de facilitar o acesso à

fonte de energia, no caso a glicose, culminando com o incremento da resposta celular inflamatória. Esses resultados sugerem reflexos positivos na resistência dos peixes alimentados com dieta suplementada às infecções. Portanto, com base nos resultados deste trabalho, nas condições em que foi conduzido, fica recomendada a utilização de suplementação alimentar com 18 mg de carboquelato de cromo/kg de ração como forma de prevenir enfermidades em peixes confinados.

O carboquelato de cromo na inflamação crônica por corpo estranho

Com base nas observações anteriores, esta parte do presente capítulo teve como objetivo avaliar o efeito da alimentação com ração suplementada com cromo trivalente sobre o acúmulo de macrófagos e a formação de células policariontes em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de pacus.

Para o ensaio foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com 12 tratamentos seguindo o esquema fatorial 4x3, sendo: quatro níveis de carboquelato de cromo trivalente (0, 12, 18 e 36 mg/kg) e três períodos (2,6 e 12 dias). Os resultados foram submetidos à análise de variância. Para os valores de F com diferença significativa ($p<0,05$) foi utilizado o teste de Tukey para comparação de médias em nível de 5% de probabilidade.

Aanálise da ração para concentação de caroquelato de cromo, o preparo das dietas e a alimentação, o implante e coleta das lamínulas e a quantificação de macrófagos e células policariontes seguiu as técnicas anteriormente descritas.

Os resultados demonstram que em nenhum dos grupos avaliados dois dias após o implante, a formação de células gigantes estavam presentes, apenas foram observados macrófagos isolados. Porém, nos grupos avaliados seis dias após o implante foi observada a presença de grande número de células gigantes do tipo corpo estranho com 2 a 10 núcleos. Havia raras células gigantes do tipo Langhans. Houve diferença estatística entre os grupos 0 mg e 18 mg/kg quanto às células gigantes tipo corpo estranho, células gigantes totais, quando o número de núcleos considerado variou de 11 a 20 e de 21 a 30, com incremento do número de células gigantes no grupo que recebeu a concentração de 18 mg de carboquelato de cromo/kg de ração.

A análise dos grupos de 12 dias após o implante mostrou aumento no número de células tipo Langhans, mas não é possível, estatisticamente, creditar esse aumento à suplementação com cromo, podendo estar ligado à cronicidade do processo. Não houve diferença estatística entre os grupos neste período. Os valores absolutos e medianas encontrados nas contagens realizadas são mostrados nas Tabelas 33-34. A utilização da mediana foi necessária devido aos valores não se enquadrarem em uma curva normal.

Porém, as células de Langhans que representam um estágio mais maduro das células do tipo CE (Mariano & Spector, 1974), segundo Petric et al. (2003a, b) predominam nas lamínulas após 14 dias.

Tabela 33. Valores absolutos para a contagem de células gigantes em lamínulas implantadas em pacu *P. mesopotamicus*. Dados representam o número total de células gigantes encontradas por grupos nos quatro tratamentos e três tempos e quantidade de células gigantes com diferente número de núcleos.

		Tipo de célula gigante			Número de núcleos			
Dias	Tratamento	CE	Langhans	Total	2 a 10	11 a 20	21 a 30	> 30
2	0 mg	0	0	0	0	0	0	0
	12 mg	0	0	0	0	0	0	0
	18 mg	0	0	0	0	0	0	0
	36 mg	0	0	0	0	0	0	0
6	0 mg	138	3	141	108	25	3	6
	12 mg	213	5	218	153	47	14	4
	18 mg	277	1	278	172	76	23	7
	36 mg	186	1	187	125	52	10	1
12	0 mg	119	9	128	90	26	12	3
	12 mg	204	20	224	171	44	7	2
	18 mg	232	22	254	151	75	14	1
	36 mg	194	25	219	144	58	8	6

Tabela 34. Medianas e resultados da análise de variância para a contagem de células gigantes em lamínulas implantadas em pacu *P. mesopotamicus*.

		Tipo de célula gigante			Número de núcleos			
Dias	Tratamento	CE	Langhans	Total	2 a 10	11 a 20	21 a 30	> 30
2	0 mg	0^{AB}	0^{AB}	0^{AB}	0^{AB}	0^{AB}	0^{AB}	0^{AB}
	12 mg	0^{AB}	0^{AB}	0^{AB}	0^{AB}	0^{AB}	0^{AB}	0^{AB}
	18 mg	0^{AB}	0^{AB}	0^{AB}	0^{AB}	0^{AB}	0^{AB}	0^{AB}
	36 mg	0^{AB}	0^{AB}	0^{AB}	0^{AB}	0^{AB}	0^{AB}	0^{AB}
6	0 mg	$16{,}5^{B}$	0^{AB}	$16{,}5^{AB}$	$12{,}5^{AB}$	$3{,}5^{B}$	0^{B}	0^{AB}
	12 mg	26^{AB}	0^{AB}	26^{AB}	$17{,}5^{AB}$	$6{,}5^{AB}$	2^{AB}	0^{AB}
	18 mg	$34{,}5^{A}$	0^{AB}	$34{,}5^{AB}$	22^{AB}	9^{A}	$2{,}5^{A}$	0^{AB}
	36 mg	$25{,}5^{AB}$	0^{AB}	$25{,}5^{AB}$	14^{AB}	$5{,}5^{AB}$	1^{AB}	0^{AB}
12	0 mg	15^{AB}	1^{AB}	15^{AB}	12^{AB}	3^{AB}	1^{AB}	0^{AB}
	12 mg	28^{AB}	$2{,}5^{AB}$	29^{AB}	$21{,}5^{AB}$	6^{AB}	$0{,}5^{AB}$	0^{AB}
	18 mg	$32{,}5^{AB}$	2^{AB}	34^{AB}	19^{AB}	12^{AB}	1^{AB}	1^{AB}
	36 mg	$23{,}5^{AB}$	$3{,}5^{AB}$	28^{AB}	$16{,}5^{AB}$	7^{AB}	1^{AB}	$0{,}5^{AB}$

Mediana e análise de variância de células gigantes encontradas por grupos nos quatro tratamentos e três tempos e quantidade de células gigantes com diferente número de núcleos. Letras diferentes indicam diferença estatística. Houve diferença estatística ($p<0{,}05$) apenas entre os grupos 0 mg e 18 mg quanto ao número de células gigantes tipo corpo estranho, células gigantes totais, número de número de núcleos de 11 a 20 e número de número de núcleos de 21 a 30, com um incremento de células gigantes no grupo 18 mg.

A ausência de células gigantes nos grupos avaliados dois dias após o implante, provavelmente é devida à precocidade da colheita, como anteriormente observado por Belo (2006). Petric et al. (2003a) demonstraram que os gigantócitos iniciam sua formação no terceiro dia, com aumento no número de células gigantes e de núcleos até o sétimo dia, ficando estável até o 14º dia.

Nos grupos avaliados seis dias após o implante foi observada a presença de grande número de células gigantes do tipo corpoestranho, em acordo com a literatura (Mariano; Spector, 1974; Petric et al., 2003a;b; Belo et al., 2005), mas raras células gigantes do tipo Langhans. Belo et al. (2005) observaram células gigantes do tipo Langhans a partir do sétimo dia. Petric et al. (2003a,b) e Brum (2003) observaram que após três dias já estão presentes gigantócitos com dois a três núcleos. Com o decorrer do tempo o fenômeno evolui e o número de gigantócitos tende a aumentar progressivamente até 12 dias após o implante e os gigantócitos do tipo corpo estranho evoluem gradativamente para o tipo Langhans.

No sexto dia após o implante, houve diferença significativa ($p<0,05$) entre o grupo que não recebeu alimentação suplementada e o que recebeu 18 mg/kg quando se considera as células gigantes tipo corpo estranho, células gigantes totais, com 11 a 20 e 21 a 30 núcleos. Essa diferença deveu-se ao aumento do número de células gigantes no grupo que recebeu alimentação suplementada com 18 mg/kg. Este resultado reafirma o observado por Castro (2008), onde os peixes que receberam a ração suplementada com 18 e 36 mg de cromo/kg incrementaram a resposta inflamatória aguda e reduziram a glicemia, demonstrando a potencialização da ação da insulina. Fujimoto et al. (2005) observaram que nesta concentração houve diminuição na concentração plasmática de cortisol nos primeiros sete dias, fato que favorece a resposta inflamatória. Então o cromo trivalente favorece o desenvolvimento da reação inflamatória na sua fase aguda como verificado por Castro (2008) e neste ensaio, nas fases iniciais da reação inflamatória crônica por corpo estranho, pelo menos em parte, por aumentar a disponibilidade de glicose para o fenômeno e por reduzir a liberação de cortisol endógeno como demonstrado por Fujimoto et al. (2005).

Não houve diferença estatística entre os grupos neste período, talvez devido à adaptação dos animais. Fujimoto et al. (2005), constataram que pacus mantidos em diferentes densidades de estocagem e alimentados com ração suplementada com cromo trivalente, após sete dias, apresentaram menor concentração plasmática de cortisol nos peixes alimentados com dieta suplementada com 18 mg de carboquelato de cromo/kg de ração. Porém, após 30 dias não havia diferença estatística. Os resultados deste experimento, em acordo com Fujimoto et al. (2005) demonstra que a suplementação alimentar com carboquelato de cromo tem sua melhor resposta nos primeiros dias após estímulos estressantes.

Assim, esses resultados sugerem que a suplementação dietética com cromo trivalente na concentração de 18 mg/kg mostrou eficiência no incremento do acúmulo de macrófagos e formação de células gigantes no sexto dia após implante de lamínula de vidro no tecido subcutâneo em *P. mesopotamicus*. Além disso, que essa suplementação pode exercer efeitos benéficos para o sistema de defesa contra a instalação de processos infecciosos (Garrido, 2009).

Considerações finais

A inflamação e a cicatrização são fenômenos complexos em função dos diferentes mecanismos de ação de substâncias farmacologicamente ativas liberadas, sintetizadas ou neoformadas no processo, bem como pelos vários moduladores e pela dinâmica da participação de estruturas vasculares, celulares e teciduais. Dessa forma, são processos que requerem demanda energética para que possam acontecer, visto que em deficiência de insulina a situação de citoglicopenia deprime o processo. Do mesmo modo, a deficiência protéica na alimentação inibe a resposta inflamatória no que tange a participação de vasos e células, ocorrendo o mesmo quando a concentração plasmática de costicosteroides está elevada. Todavia, em qualquer desses casos o padrão de resposta permanece inalterado, havendo apenas redução de intensidade.

O confinamento de peixes em pequenos espaços e em grande número contraria o determinado pela sua evolução genética que se passou em ambiente silvestre. Ou seja, peixes criados em cativeiro e sujeitos às práticas de piscicultura estão mantidos em condições adversas. Assim, é possível que tenham alta demanda por energia, mesmo quando os níveis de cortisol considerados preocupantes não sejam detectados pelas técnicas disponíveis atualmente. Então é possível que ao terem sua dieta suplementada com vitamina C, vitamina E, parede celular de levedura, levedura autolisada, carboquelato de cromo e outros neutracêuticos, de alguma forma alcancem maior patamar homeostático, facilitando as respostas fisiopatológicas como um todo.

Portanto, mais do que particularidades de respostas de células ou humores dos sistemas de defesa, o efeito dessas substâncias provavelmente está relacionado a uma melhor condição orgânica. Nos casos estudados e aqui descritos, um componente comum que resulta das dietas com os diferentes tipos de suplementação é a redução da concentração plasmática de cortisol.

O estresse agudo ou crônico e o consequente aumento da concentração plasmática de cortisol causam vários efeitos deletérios ao hospedeiro, dentre os quais a imunossupressão ocupa papel relevante, e de grande preocupação principalmente em cultivo. Com os teores de cortisol plasmático elevados há inibição da produção de várias substâncias pró-inflamatórias, como os eicosanoides derivados do ácido araquidônico, da liberação de interleucina 1 e fator de necrose tumoral, do fator ativador de plaquetas, da atividade do sistema complemento, da atividade lisozima e da produção de IG M. Todas essas substâncias estão direta ou indiretamente envolvidas na resposta inflamatória e consequentemente nos mecanismos de defesa contra infecções. Quando sua produção ou atividade está inibida ou bloqueada, dependendo do mediador ou modulador envolvido, ocorrem prejuízos que vão desde a adesão leucócito/endotélio até deficiências da atividade microbicida, passando pela diapedese, quimiotaxia e fagocitose, comprometendo ações de mecanismo de defesa celular. Essas defesas também podem estar comprometidas nos casos em ocorra leucopenia pela ativação intravascular das células de defesa, como ocorre na septicemia e na endotoxemia ou pela depressão da sua produção como ocorre em diferentes tipos de intoxicações.

De outro lado, prejuízos da atividade do sistema complemento, da lisozima e da produção de anticorpos comprometem as defesas humorais. O incremento da resposta inflamatória pela melhora do patamar homeostático em geral, facilitando as respostas fisiopatológicas e a atividade dos elementos que participam dos fenômenos de defesa é uma idéia atraente.

Assim, o ponto crucial a ser focado é a manutenção em baixa concentração de cortisol plasmático, ou a redução máxima possível das causas de estresse nos sistemas de produção. Cuidados com a qualidade da água e o ambiente e a redução dos fatores de estresse de manejo zootécnico devem ser considerados também.

A suplementação alimentar como recurso antiestressante e, portanto, profilático, deve ser orientada não só pela eficiência do suplemento, mas também pelas facilidades de obtenção, estocagem, arraçoamento, palatabilidade e relação custo/benefício. Nesse caso merece destaque a levedura *Saccharomyces cerevisiae.*

Finalmente, a desinfecção e higienização de instalações e de instrumentos de manejo, exames clínicos e laboratoriais antes da introdução de alevinos ou mesmo peixes maiores no sistema de produção, bem como o uso de quarentenários são medidas desejáveis.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa (PQ) concedida a F.R.Moraes e J.R.E. Moraes.

Referências

ACHARYA, H. R.; PANICKER, R. G. 1998. Stomach complex of developing and adult birds: biochemical and histochemical studies on non-specific acid and alkaline phosphatases. *J. Anim.Morphol. Physiol.*, 45:86-92.

AFONSO, A.; ELLIS, A. E.; SILVA, M. T. 1997. The leucocyte population of the unstimulated peritoneal cavity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunol.*, 7:335-348.

AFONSO, A.; MACEDO, P. M.; ELLIS, A. E.; SILVA, M. T. 2000. Glycogen granules in resting and inflammatory rainbow trout phagocytes – an ultrastructural study. *Dis. Aqua. Org.*, 42:101-110.

ALAYE-RAHY, N. 1993. Hematologia de aterinidos de aguas dulces: gênero *Chirostoma* spp. Del lado de Patzcuaro, Mich. *Cien. Pesq.*, 10:97-109.

ALBREKTSEN, S.; LIE, O.; SANDNESS, K. 1988. Ascorbyl palmitate as a dietary vitamin C source for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 71:359-368.

ANDERSEN, D. E.; REID, S. D.; MOON, T. W.; PERRY, S. F. 1991. Metabolic effects associated with chronically elevated cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquatic Sc.*, 48:1811-1817.

ANDERSON, R. A. 1994. Stress effects on chromium nutrition of humans and farmal animals. In: BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 10., 1994. Proceedings of Alltech 10th Annual Symposium, p.267-273.

ANDERSON, D. P. 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annu. rev. fish dis.*, 2:281-307.
ANDERSON, C. D.; ROBERTS, R. J. 1975. A comparision of the effects of temperature on wound healing in a tropical and a temperate teleost. *J. fish biol.*, 7:173-182.
ANDRADE, J. I. A.; ONO, E. A.; MENEZES, G. C.; BRASIL, E. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E. G. 2007. Influence of diets supplemented with vitamin C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. *Comp. Bioch. Physiol*., 146A: 576-580.
ANGIUS, C.; ROBERTS, R. J. 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J. fish dis.*, 26:499-509.
BACCARIN, A. E.; PEZZATO, L. E. 2001. Effects of molasses yeast in diets of Nile tilapia. *Pesqui. agropecu. bras.*, 36(3):549-556.
BALFRY, S. K.; HIGGS, D. A. 2001. Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistence of finfish. In: LIM, C.; WEBSTER, C. D. (Ed.). *Nutrition and Fish Health*. Binghampton: Food Product Press, p.213-234.
BARBER, D. L.; WESTERMANN, J. E. M. 1978. Occurence of the periodic acid-Schiff positive granular leucocyte (PAS-GL) in some fishes and its significance. *J. fish biol.*, 12:35-43.
BARRY, T. P.; LAPP, A. F.; KAYES, T. B.; MALISON, J. A. 1993. Validation of a microtitre plate ELISA for measuring cortisol in fish and comparison of stress responses of rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* and lake trout *(Salvelinus namaycush)*. *Aquaculture*, 117:351-363.
BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. rev. fish dis.*, 1:3-26.
BARTON, B. A.; PETER, R. E.; PAULENCU, C. R. 1980. Plasma cortisol levels of fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest, and subjected to handling, confinement, transport, and stocking. *Can. J. Fish. Aquatic Sc.*, 37:805-811.
BELETTI, M. E.; SILVA, M.; SANTOS, A. L. Q.; MANNA, F. D.; SOARES, J. M.; FERREIRA, C. A. Q. 1998. Ultrastructural study of thrombocytes of *Arapaima gigas*. *Biosci. j.*, 14:3-10.
BELO, M. A. A. 2006. *Efeito da densidade populacional e da suplementação alimentar com vitamina E sobre respostas de defesa não-específicas em tilápias do Nilo (Oreochromis niloticus), vacinadas e desafiadas com Mycobacterium marinum*. 112 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal.
BELO, M. A. A.; SCHALCH, S. H. C.; MORAES, F. R.; SOARES, V. E.; OTOBONI, A. M. M. B.; MORAES, J. E. R. 2005. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish (*Piaractus mesopotamicus*). *J. comp. pathol.*, 133:146–154.
BEREITER-HAHN, J.; MATOLTSY, A. G.; RICHARDS, K. S. 1986. Epidermal cell migration and wound repair. In: BEREITER-HAHN, J.; MATOLTSY, A. G.; RICHARDS, K. S. (Ed.). *Biology of the Integument, Vertebrates*. Berlin: Springer, v. 2, p. 443-471.

BLAXHALL, P. C. 1983. Electron microscope studies of fish lymphocytes and thrombocytes. *J. fish biol.*, 22:223-229.

BLAXHALL, P. C.; DAISLEY, K. W. Routine hematological methods for use with fish blood. *J. fish biol.*, 5:771-781.

BLAZER, V. S.; WOLKE, R. E. 1983. Ceroid deposition, retinal degeneration and renal calcium oxalate crystals in culture clownfish. *J. fish dis.,* 1:3-26.

BODAMMER, J. E. 1986. Ultrastructural observations on peritoneal exudate cells from the striped bass. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 12:127-140.

BOOMKER, J. 1981. The haemocytology and histology of the haemopoietic organs of south African freshwater fish. III. The leucocytes, plasma cells and macrophages of *Clarias gariepinus* and *Sarotherodon mossambicus*. *J. vet. res.*, 48:185-193.

BOZZO, F. R. 2007. *Inflamação por Aeromonas hydrophila inativada e tioglicolato em Piaractus mesopotamicus suplementados com vitamina C, E ou sua associação*. 78 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unesp, Jaboticabal.

BOZZO, F. R.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R.; PEREIRA, G.; TAVARES-DIAS, M.; ONAKA, E. M. 2007. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). *J. World Aquac. Soc.*, 38:302-308.

BRICKNELL, I.; DALMO, R. A. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*, 19(5):457-472.

BRUM, C. D. 2003. *Efeito do estresse e da suplementação alimentar com vitamina C sobre a formação de gigantócitos em Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887*. 76 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unesp, Jaboticabal.

BRUNO, D. W.; MUNRO, L. S. 1986. Haematological assessment of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., infected with *Renibacterium salmoniarum*. *J. fish dis.*, 9:195-204.

BULLOCK, A. M.; MARKS, R.; ROBERTS, R. J. 1978a. The cell kinetics of teleosteos fish epidermis: mitotic activity of the normal epidermis at varying temperatures in plaice (Pleuronectes platessa). *J. Zool.*, 184:423-428.

BULLOCK, A. M.; MARKS, R.; ROBERTS, R. J. 1978b. The cell kinetics of teleosteos fish epidermis: Epidermal mitotic activity in relation to wound healing at varying temperatures in plaice (*Pleuronectes platessa*). *J. Zool.*, 185:197-204.

BURROWS, A. S.; FLETCHER, T. C.; MANNING, M. J. 2001. Haematology of turbot, *Psetta maxima* (L.): ultrasctrural cytochemical and morphological properties of peripheral blood leucocytes. *J. appl. ichthyol.*, 17:77-84.

CAMARGO, F. T.; COSTA, J. R. V.; SOUZA-CRUZ, A. C.; ROCHA, W.; VIGNOLI, V. V. 1986/1987. Estudo das séries hematológicas da traíra *Hoplias malabaricus* (Pisces - Teleostea). Rev*. Escola Farm. Odontol. Alfenas*, 9: 63-69.

CANNON, M. S.; MOLLERNHAUER, H. H.; EURELL, T. E.; LEWIS, D. H.; CANNON, A. M.; TOMPKINS, C. 1980. An ultrastructural study of the leukocytes of the channel catifish *Ictalurus punctatus. J. Morph.*, 164:1-23.

CASTRO, M. P. 2008. *Desempenho produtivo e resposta inflamatória de pacu* (*Piaractus mesopotamicus*) *alimentados com ração suplementada com cromo trivalente*. 102 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CHATTERRJEE, I. B.; MAJUNMDER, A. K.; NANDI, B. K.; SUBRAMANIAN, N. 1975. Synthesis and major functions of vitamin C in animals. *Ann. New York Acad. Sc.*, 258:24-48.

CHEN, D.; AINSWORTH, A. J. 1992. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafineque. *J. Fish Dis.*, 15:295–304.

CHEN, R. G.; LOCHMANN, R. T.; GOODWIN, A.; PRAVEEN, K.; DABROWSKI, K.; LEE, K. J. 2004. Effects of dietary vitamin C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentration and response to heat stress in juvenile golden shiners (*Notemigonus crysoleucas*). *Aquaculture*, 242:553-569.

CORREA, P.; ARIAS-STELLA, J.; PEREZ-TAMAYO, R.; CARBONELL, L. M. 1975. *Texto de Patologia*. 2. ed. [México]: La Prensa Mexicana, 1162 p.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. 2004. *Robbins - Patologia Estrutural e Funcional*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1251p.

COZZOLINO, S. M. E. 1982. *Valor nutritivo da biomassa de Saccharomyces cerevisiae. Estudo em gerações sucessivas de ratos*. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

CUESTA, A.; ANGELES-ESTEBAN, M.; MESEGUER, J. 1999. Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes assessment by flow cytometry and microscopy. *Vet. Immunol. Immunopathol.,* 71:161-171.

DAIMON, T.; GOTOH, Y.; KAWAI, K.; UCHIDA, K. 1985. Ultrastructural distribution of peroxidase in thrombocytes of mammas and submammals. *Histochemistry*, 82:345-350.

DaMATTA, R. A.; RIBEIRO, M. L. S.; CARVALHO, T. M. U.; NASCIMENTO, J. L. M. 2009. Caracterização morfológica e funcional de leucócitos de peixes. In: TAVARES-DIAS, M. (Org). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá, p.314-329.

DANILOVA, N.; BUSSMANN, J.; JEKOSCH, K.; STEINER, L. A. 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin. *Nat. immunol.*, 6(3):295-302.

DAVIS, K. B.; PARKER, N. C. 1986. Plasma corticosteroid stress response of fourteen species of warmwater fish to transportation. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 115:495-499.

DAVIS, K. B.; TORRANCE, P.; PARKER, N. C.; SUTTLE, M. A. 1985. Growth body composition and hepatic lyrosine aminotransferase activity in cortisol-fed channel catfish, Ictalurus punctatus Rafinesque. *J. fish biol.*, 27:177-184.

DINARELLO, C. A. 1984. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute phase response. *N. Engl. J. Med.* 311:1413-1418.

DOGGET, T.A.; WRATHMELL, A.B. & HARRIS, J.E. 1987. A cytochemical and ligth microscopical study of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*, Cichlidae. *J. Fish Biol*, 31:147-153.

DOGGETT, T. A.; HARRIS, J. E. 1989. Ultrastructure of the peripheral blood leucocytes of Oreochromis mossambicus. *J. fish biol.*, 33:747-756.

DUTTA, M.; RAI, A. K. 1994. Pattern of cutaneous wound healing in a live fish *Clarias batrachus* (L) (Clariidae, Pisces). *J Indian Fish Assoc*, 24:107-113.

ELLIS, A. E. 1976. The leucocytes of fish: a review. *J. fish biol.*, 8:143-156.

ELLIS, A. E. 1977. Leucocytes and related cells in the plaice, *Pleuronectes platessa*. *J. Fish Biol.*, 11:453-491.

FARSKY, S. P.; SANNOMYIA, P.; GARCIA LEME, J. 1995. Secreted glucocorticoids regulate leukocyte-endothelial interactions in inflammation. A direct vital microscopic study. *J. leukoc. biol.*, 57:379-386.

FEVOLDEN, S. E.; REFSTIE, T.; ROED, K. H. 1992. Disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for stress response. *Aquaculture*, 104:19-29.

FLOWER, R. J. 1986. The mediators of steroid action. *Nature*, 320:20.

FRACALOSSI, D. M.; LOVELL, R. T. 1994. Dietary lipid sources influence responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to challenge with the pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *Aquaculture*, 119:287-298.

FUJIMOTO, R. Y.; CASTRO, M. P.; HONORATO, C. A.; MORAES, F. R. 2007. Composição corporal e eficiência de utilização de nutrientes por pacus alimentados com ração suplementada com cromo trivalente. *Pesq. Agropec. Bras.*, 42(12):1763-1768.

FUJIMOTO, R. Y.; CASTRO, M. P.; MORAES, F. R.; GONÇALVES, F. D. 2005. Efeito da suplementação alimentar com cromo trivalente em pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), mantido em diferentes densidades de estocagem. Parâmetros fisiológicos. *B. Inst. Pesca*, 31 (2):155-162.

FURUYA, W. M.; PEZZATO, L. E.; PEZZATO, A. C.; BARROS, M. M.; MIRANDA, E. C. 2001. Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Bras Zootec*, 30(4):1143-1149.

GARCIA, F.; PILARSKI, F.; ONAKA, E. M.; MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. 2007. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila. Aquaculture,* 271(1-4):39-46.

GARCIA-LEME, J. 1989. *Hormones and Inflammation*. Boca Raton: CRC Press, 238 p.

GARCIA LEME, J.; SHAPOVAL, E. E. S. 1975. Stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by compounds formed in inflamed tissue. *Br. J. Pharmacol*, 53:75-83.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K. L.; PACHALY, J. R. 1994. *Manual de Hematologia Veterinária*. São Paulo: Varela, 169p.

GARRIDO, E. 2009. *O carboquelato de cromo na inflamação crônica por corpo estranho em Piaractus mesopotamicus*. 33 f. Trabalho de Conclusão (Treinamento em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unesp, Jaboticabal.

GATLIN, D. M. 2002. Nutrition and health. In: HALVER, J. E.; HARDY, R. W. (Ed.). *Fish Nutrition*. San Diego, California: Academic Press, p. 671-702.

GILL, C. 1991. Vitamin C in aquafeeds. The quest for better stability. *Feed International*, october, p.6-10.

GONÇALVES, G. S. 2003. *Digestibilidade aparente de alimentos vegetais suplementados com fitase pela tilápia do Nilo* (*Oreochromis niloticus*). 72 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

GUERRERO-ROMERO, F.; RODRÍGUEZ-MORÁN, M. 2005. Complementary therapies for diabetes: the case for chromium, magnesium and antioxidants. *Arch Med Res*, 36:250-57.

GUITANG, W. 1998. Changes in blood cells of Tiger puffer, Takifugu rubripes caused by the infection with the monogenean *Heterobothrium okamotoi*. *Acta hydrobiol.*, 22:83-88.

HALVER, J. E. 1995. Vitamim requeriment study techniques. *J. appl. ichthyol.*, 11:215-228.

HAMRE, K.; WAAGBO, R.; BERGE, R. K.; LIE, O. 1997. Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic Salmon (*Salmo salar,* L.). *Free Radic. Biol. Med.*, 22(1/2):137-149.

HANSEN, J. D.; LANDIS, E. D.; PHILLIPS, R. B. 2005. Discovery of a unique Ig heavy chain isotype (IgT) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc. Natl Acad Sci*, 102:6919-6924.

HARDIE, L. J.; ELLIS, A. E.; SECOMBES, C. J. 1996. In vitro activation of rainbow trout macrophages stimulates kiling of Renibacterium salmoninarum concomitant with augmented generation of respiratory burst products. *Dis Aquat Org*, 25:75-183.

HARKNESS, R. A. 1981. The characteristic cell acute inflammation. The polymorphonuclear neutrophil leucocyte, and its biochemistry. *Mol. Aspects Med.,* 4:191-207.

HENDERSON, R. J.; TOCHER, D. R. 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Progressive Lipid Research*, 26:281-347.

HIBBS JUNIOR, J. B. 1992. Overview of cytotoxic mechanism and defense of the intra-cellular environment against microbes. In: MONCADA, S.; MARLETTA, M. A.; HIBBS JUNIOR, J. B.; HIGGS, E. A. (Ed.). *The biology of Nitric Oxide*. 2. Enzymology, Biochemistry and Immunology. London: Portland Press, p. 201-206.

HICKEY JUNIOR, C. R. 1982. Comparative hematology of wild and captive cunners. *Transactions of the American Fisherires Society*, 111:242-249.

HILL, D. J.; ROWLEY, A. F. 1996. The thromboxane mimmetic, U-46619, induces the aggregation of fish thrombocytes. *Br. J. Haematol.*, 92:200-211.

HINE, P. M.; WAIN, J. M.; BOUSTEAD, N. C.; DUNLOP, D. M. 1986. Light and electron microscopic studies on the enzyme cytochemistry of leucocytes of eels, Anguilla species. *J Fish Biol*, 29:721-735.

HIRONO, I.; NAM, B. H.; ENOMOTO, J.; UCHINO, K.; AOKI, T. 2003. Cloning and characterization of a cDNA encoding Japanese flounder Paralichthys olivaceus IgD. *Fish Shellfish Immunol.*, 15:63-70.

HOPWOOD, D. 1990. Fixation and fixatives. In: BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. *Theory and Practice of histological techniques*. 3. ed. Nova Iorque, Churchil Livingstone, p. 21-42.

HOUSTON, A. H.; DOBRIC, N.; KAHURANANGA, R. 1996. The nature of hematological response in fish. Studies on rainbow trout *Oncorhyncus mykiss* exposed to simulated winter, spring and summer conditions. *Fish Physiol. Biochem.*, 15:339-347.

IGER, Y.; ABRAHAM, M. 1990. The process of skin healing in experimentally wounded carp. *J Fish Biol*, 36:421-437.

IWASHITA, M. K. P.; MORAES, J. R. E.; OZÓRIO, R. O. A.; REMA, P.; MORAES, F. R. 2009. Influence of vitamin E supplementation on dermal wound healing in Tilapia, *Oreochromis niloticus. Aquaculture*, (no prelo).

JAKOWSKA, S. 1956. Morphologie et nomenclature des célules du sang des teleóstins. *ReviewHemat.*, 11:519-539.

JANG, S. L.; HARDIE, L. J.; SECOMBES, C. J. 1996. Elevation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity with macrophage-derived supernadants. *J. Leukoc. Biol.*, 57:943-947.

JANG, S. L.; MULERO, V.; HARDIE, L. J.; SECOMBES, C. J. 1995. Inhibition of rainbow trout phagocyte responsiveness to human tumor necrosis factor α (hTNFα) with monoclonal antibodies to the hTNFα 55 kDa receptor. *Fish Shellfish Imunol.*, 5:61-69.

JANSSON JUNIOR, C. W.; WAALER, E. 1967. Body temperature, antibody formation and inflammatory response. *Acta Pathol.Microbiol. Scandinava*, 69: 577-66.

JAUNCEY, K.; SOLIMAN, A.; ROBERTS, J. R. 1985. Ascorbic acid requirements in relation to wound healing in the cultured tilapia *Oreochromis niloticus* (TREWAVAS). *Aquacult. Fish Manag.*, 16:139-149.

JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D.; JENEY, Z.; ANDERSON, D. P. 1997. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different dosis of glucan. *Aquaculture*, 154:1-15.

JORGENSEN, J. B.; LUNDE, H.; ROBERTSEN, B. 1993. Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo Salar*, L. *J. Fish Dis.*, 16:313-325.

JUNQUEIRA, L. C. U.; MONTES, G. S.; SANCHEZ, E. M. 1982. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by picrosirius-polarization method. *Histochemistry*, 74:153-156.

KIRON, V.; FUKUDA, H.; TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. 1995. Essential fatty acid nutrition and the defense mechanism in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 111A:361-367.

KLLUGE, J. P. 1965. A granulomatous disease of fish produced by flavobacteria. *Pathol. Vet.*, 2:545-552.

KODAMA, H.; BABA, T.; OHISHI, I. 1994. Inhibition of phagocitosis by rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*) macrophages by botulinum C2 toxin and its trypsinized component H. *Dev. Comp. Immunol.*, 18:389-395.

KÖLLNER, B.; FISCHER, U.; ROMBOUT, J. H. W. M.; TAVERNE-THIELE, J. J.; HANSEN, J. D. 2004. Potential involvement of rainbow trout thrombocytes in immune functions: a study using a panel of monoclonal antibodies and RT-PCR. *Dev. Compend. Immunol.*, 28:1049–1062.

KOLMAN, H.; TERECH-MAJWWASKA, E.; KOLMAN, R.; SZAREK, J.; SWIATECKI, A. 2003. The ingestion of *Aeromonas salmonicida* by fish

blood phagocytes in vitro under influence of herbicides. *Acta Piscaria*, 2:123–130.

KOZINSKA, A.; ANTYCHOWICZ, J.; KOSTRZEWA, P. 1999a. Influence of thrombocyte activity on the susceptibility of the carp (*Cyprinus carpio* L.) to *Aeromonas hydrophila* infection in different temperature. *Bull. Vet. Inst. Pulaway*, 43:43-53.

KOZINSKA, A.; ANTYCHOWICZ, J.; KOSTRZEWA, P. 1999b. Relationship between the thrombocyte activity and the susceptibility of the carp (*Cyprinus carpio* L.) to *Aeromonas hydrophila* infection in different seasons. *Bull. Vet. Inst. Pulaway*, 43:63-69.

KOZINSKA, A.; ANTYCHOWICZ, J.; KOSTRZEWA, P. 1999c. Influence of thrombocyte activity on the susceptibility of the carp (Cyprinus carpio L.) to Aeromonas hydrophila infection in different temperature. *Bull. Vet. Inst. Pulaway*, 43:43-53.

KULKARNI, A. D.; FANSLOW, W. C.; RUDOLPH, F. B.; BUREN, C. T. 1987. Modulation of delayed hypersensitivity in mice by dietary nucleotide restriction. *Transplantation,* 44:847-849.

KUSUDA, R.; IKEDA, Y. 1987. Studies on classification of eel leucocytes. *Nipp. Suisan Gakkaishi*, 53:205-209.

LALL, S. P.; LEWIS-MCCREA, L. M. 2007. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish: an overview. *Aquaculture*, 267:3–19.

LAMAS, J.; ELLIS, A. E. 1994. Electron microscopic observations of the phagocytosis and subsequent fate of *Aeromonas salmonicida* by Atlantic salmon neutrophils in vitro. *Fish Shellfish Immunol.*, 4:539-546.

LAMAS, J.; SANTOS, Y.; BRUNO, D. W.; TORANZO, A. E.; ANADÓN, R. 1994b. Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). *J.Fish Biol.*, 45(5):839-854.

LEATHERLAND, J. F. 1987. Thyroid response to ovine thyrotropin challenge in cortisol-treated and dexamethasone-treated rainbow-trout *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86B:383-388.

LI, M. H.; JOHNSON, M. R.; ROBINSON, E. H. 1993. Elevated dietary vitamin C concentrations did not improve resistance of channel catfish *Ictalurus punctatus*, against *Edwardsiella ictaluri* infection. *Aquaculture*, 117:303-312.

LI, Y. P.; LOVELL, R. T. 1985. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. *Journal of Nutrition*, 115:123-131.

LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M.; KLESIUS, P. H. 2005. Nutrition, immune response and disease resistance in fish. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES, 1., 2005. Anais... Botucatu: Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, p. 46-83.

LITMAN, G. W.; ANDERON, M. K.; RAST, J. P. 1999. Evolution of antigen binding receptors. *Annual Review of Immunology*, 17:109-147.

LOONSTROM, L. G.; RA KONEM, R.; LUNDREN, T.; PASTERNACK, M.; KOSKELA, J.; GRONDAHL, A. 2000. Protection, immune response, and side effects in European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) vaccinated against vibriosis and furunculosis. *Aquaculture*, 200(3/4):271-284.

LÓPEZ-RUIZ, A.; ANGELES-ESTEBAN, M.; MESEGUER, J. 1992. Blood cells of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): ligth and electron microscopic studies. *Anat. Record*, 234:161-171.

LORENZI, T. F. 1999. *Manual de hematologia propedêutica e clínica*. São Paulo: MDSI, 641p.

MABÍLIA, R. G. *Alimentação e nutrição dos peixes ornamentais*. 2005. Disponível em: www. aquaforum.com.br/ phpBB2/ viewtopic.php?p=147&. Acesso em: xx maio 2009.

MAcARTHUR, J. I.; FLETCHER, T. C.; PIRIE, B. J. S.; DAVIDSON, R. J. L.; THOMSON, A. W. 1984. Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of stress and endotoxin. *Journal of Fish Biology*, 25:69-81.

MAJNO, G.; JORIS, I. 1996. *Cells, Tissues and Diseases. Principles of General Pathology*. Massachusetts: Blackwell Sci., 974p.

MARIANO, M. 1995. The experimental granuloma. A hypothesis to explain the persistence of the lesion. *Rev. Inst. Med. Tropical*, 37(2):161-176.

MARIANO M.; SPECTOR, W. G. 1974. The formation and properties of macrophage polycarions (inflammatory giant cells). *J. Pathol.*, 113:119.

MARTINS, M. L. 2000. *Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887 estressados*. 125 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

MARTINS, M. L. 1998. Evaluation of the addition of ascorbic acid to the ration of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) on the infrapopulation of *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31:655-658.

MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; FUJIMOTO, R. Y.; ONAKA, E. M.; BOZZO, F. R.; MORAES, J. R. E. 2006. Carrageenin induced inflammation in *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) cultured in Brazil. *B. Inst. Pesca*, 32:31-39.

MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E.; MALHEIROS, E. B. 2000. Falha na resposta do cortisol estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). *Acta Scientiarum*, 22:545-552.

MARTINS, M. L.; MIYAZAKI, D. M.; MORAES, F. R.; GIRALDELLI, L.; ADAMANTE, W. B.; MOURIÑO, J. L. P. 2008. Ração suplementada com vitaminas C e E influencia a resposta inflamatória aguda em tilápia do Nilo. *Ciência Rural*, 38:213-218.

MARTINS, M. L.; MYAZAKI, D. M. Y.; TAVARES-DIAS, M.; FENERICK JUNIOR, J.; ONAKA, E.M.; BOZZO, F. R.; FUJIMOTO, R.Y.; MORAES, F. R. 2009. Characterization of the inflammatory response in the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male x *Colossoma macropomum* female (Osteichthyes). *Braz. J. Biol*., 69:631-637.

MATSUYAMA, H.; YANO, T.; YAMAKAWA, T.; NAKAO, M. 1992. Opsonic effect of the third complement component (C3) of carp (*Cyprinus carpio*) on phagocytosis by neutrophils. *Fish Shellfish Immunol.*, 2:69-78.

MATUSHIMA, E. R. 1994. *Avaliação do processo inflamatório crônico granulomatoso induzido experimentalmente através da inoculação de BCG em peixes da espécie Oreochromis niloticus – Tilápia do Nilo*. 118 f. Tese

(Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

MATUSHIMA, E. R.; MARIANO, M. 1996. Kinects of the inflammatory reaction induced by carrageen in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). *Braz. J. Vet. Res. Animal Sc.*, 33:5-10.

MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F. 1981. *Adrenergic response to stress in fish*. In: PICKERING, A. D. *Stress and Fish*. London: Academic Press, p. 49-75.

MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E. M. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: Some new data with a general review. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 106(3):201-212.

MAZIK, P. M.; BRANDT, T. M.; TOMASSO, J. R. 1987. Effects of dietary vitamin C on growth, caudal fin development and tolerance of aquaculture-related stressors in channel catfish. *Prog. Fish Cult.*, 49:13-16.

McCORMICK, S. D.; SHRIMPTOM, J. M.; CAREY, J. B.; O´DEA, M. F.; SLOAN, K. E.; MORIYAMA, S.; BJÖRNSSON, B. T. 1998. Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic samon parr and alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol. *Aquaculture*, 168:221-235.

MCDONALD, G.; MILLIGAN, L. 1997. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: IWANA, G. W.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Ed.). *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: University Press, p. 119-144.

MENEZES, G. C.; TAVARES-DIAS, M.; ONO, E. A.; ANDRADE, J. I. A.; BRASIL, E. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E. G. 2006. The influence of dietary vitamin C and E suplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. *Comp. Biochem. Physiol.*, 145A: 274-279.

MERTZ, W.; ROGINSKI, E. E. 1969. Effect of chromium III suplementation on growth and survival under stress in rats feed low-protein diets. *J. Nutrition*, 97:531-536.

MESEGUER, J.; ESTEBAN, A. M.; LOPEZ-RUIZ, A.; BIELEK, E. 1994a. Ultrastructure of nonspecific cytotoxic cells in teleosts. I. Effector-target cell binding in a marine and a freshwater species (seabream: *Sparus aurata* L., and carp: *Cyprinus carpio* L.). *Anatomic Record*, 239:468-474.

MESEGUER, J.; LÓPEZ-RUIZ, A.; ESTEBAN, M. A. 1994b. Cytochemical characterization of leucocytes from the seawater teleost, gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Histochemistry*, 102:37-44.

MESNIL, F. 1895. Sur le mode des resistence des vertebrades inferieures aux invasions microfiennes. *Annales de le Institute Pasteur*, 2:301-11.

METCHNIKOFF, E. 1893. *Lectures on the comparative pathology of inflammation delivered at the Pasteur Institute in 1891*. London: Kegan Paul, Trench, Trübner, 218 p.

METCHNIKOFF, E. 1905. *Immunity in Infective Diseases*. University Press.MIRANDA, E. C.; PEZZATO, A. C.; PEZZATO, L. E.; FURUYA, W. M. 2000. Disponibilidade aparente de fósforo em ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Scientarium*, 22:669-675.

MITOMA, C.; SMITH, T. E. 1960. Studies on the role of ascorbic acid in collagen synthesis. *J. Biol. Chem.*, 235:426-428.

MITTAL, A. K.; MUNSHI, J. S. D. 1974. On the regeneration and repair of superficial wound in the skin of *Rita rita* (Ham.)(Bagridae, Pisces). *Acta Anatomica*, 88:424-442.

MIYAZAKI, C. F.; KAIGE, N. 1985. Comparative histopahology of edwadsiellosis in fishes. *Fish Pathology*, 20(2-3):219-227.

MOCCIA, R. D.; HUNG, S. S. O.; SLINGER, S. J.; FERGUNSON, H. W. 1984. Effect of oxidized fish oil, vitamin E and ethoxyquin on the histopathology and hematology of raibow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *J. Fish Dis.*, 7:269-282.

MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews Fish Biol. Fish.*, 9:211-268.

MONTEIRO, D.; TORT, L.; IZQUERDO, M. S.; ROBAINA, L.; VERGARA, J. M. 1998. Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead sea bream caused by alpha-tocopherol and n-3 HUFA dietary deficiencies. *Fish Physiol. Biochem.*, 18:399-407.

MONTERO, D.; MARRERO, M.; IZQUIERDO, M. S.; ROBAINA, L.; VERGARA, J. M.; TORT, L. 1999. Effects of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjects to crowding stress. *Aquaculture*, 171:269-278.

MORAES, F. R.; GARCIA LEME, J. 1982. Endogenous corticosteroids and insulin in acute inflammation. *Microvascular Res.*, 23:281-283.

MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E.; BECHARA, G. H. 1987. Effect of alloxan diabetes and adrenalectomy on carrageenin-induced pleurisy in the rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 20(1):47-53.

MORAES, J. R. E.; FREITAS, J. B.; BOZZO, F. R.; MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. 2003. A suplementação alimentar com vitamina C acelera a evolução do processo cicatricial em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887. *B. Inst. Pesca*, 29:57-67.

MOURA, M. A. F.; FARIAS, I. P.; VAL, A. L. 1994. Effects of temperature on leucocytes of *Colossoma macropomum* and *Hoplostermum littorale* (Pisces). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 27:1589-1598.

MOURA, W. L.; OLIVEIRA, L. W.; EGAMI, M. I. 1997. Aspectos ultraestruturales de trombocitos, eosinofilos y heterofilos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodilia). *Rev. Chil. Anat.*, 13(2):201-208.

MOWAT, D. N. 1997. *Organic chromium in animal nutrition*. Guelph, Ontário: Chromium Books.

MURARI, R.; ALMEIDA, S. A.; SATAKE, T.; OGASAWARA, T. M.; LOPES, R. A. 1992. Estudo hematológico de peixes brasileiros. XXIX. Parâmetros da série leucocitária do cascudo *Hypostomus acistroides* Ihering, 1911 (Pisces, Loricariidae). *Ciência Cult.*, 44:715- 716.

NAKAGHI, L. S. O.; AZEVEDO, C.; PELLIZZON, C. H.; CASALETTI ROSA, L.; LUNARDI, L. O. 1995. Localização ultraestrutural de fosfatase ácida e peroxidase em trombócitos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: SANTOS, H. S. L. (Ed.). *Histologia de Peixes*. São Paulo: FCAV-UNESP, 126p.

NAKANISHI, T.; AOYAGI, K.; XIA, C.; DIJKSTRA, J.M.; OTOTAKE, M. 1999. Specific cell-mediated immunity in fish. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 72:101-109.

NAKANISHI, Y.; KODAMA, H.; MURAI, T.; MIKAMI, T.; IZAWA, H. 1991. Activation of rainbow trout complement by C-reactive protein. *American J. Vet. Res.*, 52:397-401.

NAVARRE, O.; HALVER, J. E. 1989. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture*, 79:207-221.

NDOYE, A.; GHANMI, Z.; KOENIG, J.; DESHAUX, P. 1990. Vitamin E et immunite: effects dela vitamine E sur la production d'anticorps anto *Yersinia ruckeri* chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairneri*). *Ichtyophysiol. Acta*, 13:17-23.

NOGA, E. J. 1996. *Fish disease. Diagnosis and treatment*. 1. ed. Raleigh: Mosby, 367p.

NOGA, E. J.; KERBY, J. H.; KING, W.; AUCOIN, D. P.; GIESBRECHT, F. 1994. Quantitative comparison of the stress response of striped bass (*Morone saxatilis*) and hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops* and *Morone saxatilis* x *Morone americana*). *Amer. J. Vet. Res.*, 55:405-409.

ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. 2001. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata*) innate immune system. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 79:167-80.

ORTUÑO, J.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. 2003. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.,* 14:145-156.

PAGE, M.; ROWLEY, A. F. 1983. A cytochemical, ligth and electron microscopical study of the leucocytes of the adult river lamprey, *Lampreta fluviatilis* (L. Gray). *J. Fish Biol.*, 22:503-517.

PALIKOVÁ, M.; KOVÁRU, F.; NAVRÁTIL, S.; KUBALA, L.; PESAK, S.; VAJCOVÁ, V. 1998. The effect of pure microcystin LR and biomass of blue-green algae on selected immunological indices of carp (*Cyprinus carpio* L.) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) *Acta Vet. Brno*, 67:265-272.

PASSANTINO, L.; CIANCIOTTA, A.; PATRUNO, R.; RIBAUD, M. R.; JIRILLO, E.; PASSANTINO, G. F. 2005. Do fish thrombocytes play an immunological role? Their cytoenzymatic profiles and function during an accidental piscine candidiasis in aquarium. *Immunoph. Immunotoxicol.,* 27:345–356.

PEINGNOUX-DEVILLE, J.; BORDAT, C.; VIDAL, B. 1989. Demonstration of bone reabsorbing cells in elasmobranchs: comparison with osteoclasts. *Tissue Cell*, 21:925-33.

PENHA, M. L.; DIAS, J. L. C.; MALUCELLI, B. E. 1996. Influence of low environmental temperature on the phagocytic activity of bullfrog (*Rana catesbeiana*) thrombocytes. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sc.*, 33(1):15-18.

PETRIC, M. C.; MARTINS, M. L.; ONAKA, E. M.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R.; MALHEIROS, E. B. 2003a. Suplementação alimentar com vitamina C potencializa a formação de macrófagos policariontes em *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887 (Osteichthyes: Characidae). *B. Inst. Pesca*, 29:69-76.

PETRIC, M. C.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. 2003 b. Polycarion macrophage formation kinetics in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). Experimental model. *B. Inst. Pesca*, 29:95-100.

PEZZATO, L. P.; BARROS, M. M.; FRACALOSSI, D. M.; CYRINO, J. E. P. 2004. Nutrição de peixes. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva*. São Paulo: TecArt, p. 75-169.

PHROMSUTHIRAK, P. 1977. Electron microscopy of wound healing in the skin of *Gasterosteus aculeatus*. *J. Fish Biol*., 11:193-206.

PITOMBEIRA, M. S.; MARTINS, J. M. 1966. A direct method for white blood count in fishes. *Arq. Est. Biol. Mar. Univers. Fed*. Ceará, 6(2):205.

PRADHAN, P. K.; MOHAN, C. V.; SHANKAR, K. M.; KUMAR, B. M. 2008. Inflammatory response in indian major carp, *Catla catla* and barb, *Puntius cauveriensis*, to Aphanomices invadans and Freund's complete adjuvant. *Asian Fish. Sc.*, 21:385-394.

PRASAD, G.; RADHAKRISHNAN, S. 1992. The leucocyte enzyme cytochemistry of the Indian eel, *Anguilla bicolor bicolor* McClelland. *J. Fish Biol.*, 41:51-154.

PULSFORD, A.; MATTHEUS, R. A. 1991. Macrophages and giant cells associated with a microsporidian parasite causing liquefaction of the skeletal muscle of the Norway pout *Trisopterusesi marki* . *J. Fish Dis.*, 14 (1):67-78.

QUILHAC, A.; SIRE, S. Y. 1999. Spreading, proliferation, and differentiation of the epidermis after wounding a Cichlid fish, *Hemichromis bimaculatus*. *Anat. Rec.*, 254:435-451.

RAA, R.; ROSTAD, G.; ENGSTAD, R.; ROBERTSEN, B. 1992. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: SHARIFF, M.; SUBASIGHE, R. P.; ARTHUR, J. R. (Ed.). *Diseases in Asian Aquaculture*. Manila, Philippines: Fish Health Section, Asian Fish. Soc., 1: 39-50.

RAMAKRISHNA, N. R.; BURT, M. D. 1991. Tissue response of fish by larval *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda; Ascaridoidea). *Can. J. Fish. Aquat Sci.*, 48:1623-1628.

RANZANI-PAIVA, M. J.; ISHIKAWA, C. M.; PORTELLA, M. C.; CELIBERTO, R. J. 1987. Hematologia da carpa comum *Cyprinus carpio*, infestada por *Argulus* sp. e após tratamento com fosfato de 0,0-dimetil-oxi-2,2,2,-tricloroetilo (Neguvon). *B. Inst. Pesca*, 14:83-92.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SALLES, F. A.; EIRAS, J. C.; EIRAS, A. C.; ISHIKAWA, C. M.; ALEXANDRINO, A. C. 1998/1999. Análise hematológica de curimbatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, Estado de São Paulo. *B. Inst. Pesca*, 25:77-83.

REQUE, V. R. 2005. *Suplementação alimentar com Saccharomyces cerevisiae na inflamação induzida por Aeromonas hydrophila em tilápias do Nilo (Oreochromis niloticus)*. 63 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

REQUE, V. R.; MORAES, J. R. E.; BELO, M. A. A; MORAES, F. R. 2009. Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae. Aquaculture* (no pelo).

RIBEIRO, W. R. 1978. *Contribuição ao estudo da hematologia de peixes. Morfologia e citoquímica das células do sangue e dos tecidos hematopoéticos do mandi amarelo, Pimelodus maculatus Lacépéde, 1803*.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

RIBEIRO, W. R.; VALERI, V. 1976. Morfologia e gênese das células sangüíneas do mandi amarelo *Pimelodus clarias* (Bloch, 1782). Família Pimelodidae. *Ciência e Cultura*, 28(7):328.

ROBERTS, R. J. 1981. *Patologia de los peces.* Madrid: Ed. Mundi-Prensa, 366p.

ROBERTSEN, B.; ENGSTAD, R.; JORGENSEN, J. B. 1994. Beta-glucans as immunostimulants in fish. In: STOLEN, J.; FLETCHER, T. C. (Ed.). *Modulators of Fish Immune Responses*. Fair Haven, NJ: SOS Publications, p. 83-99.

ROBERTSEN, B.; RORSTAD, G.; ENGSTAD, R.; RAA, J. 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J. Fish Dis.*, 13:391-400.

ROBERTSON, L.; THOMAS, P.; ARNOLD, C. R. 1988. Plasma cortisol and secondary stress responses of cultured red drum (*Sciaenops ocellatus*) to several transportation procedures. *Aquaculture*, 68:115-130.

ROBERTSON, L.; THOMAS, P.; ARNOLD, C. R.; TRANT, J. M. 1987. Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density, and a disease outbreak. *Prog. Fish Cult.*, 49:1-12.

RODRÍGUEZ, A.; CUESTA, J.; ORTUÑO, M. A.; ESTEBAN, J. M. 2003. Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata* L.). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 96:183-192.

ROSE, A. S.; LEVINE, R. P. 1992. Complement-mediated opsoniztion and phagocitosis of *Renibacterium salmoninarum*. *Fish Shellfish Immunol.*, 2:223-240.

ROTLLAND, J.; PAVLIDIS, M.; KENTOURI, M.; ABAD, M. E.; TORT, L. 1997. Non-specific immune reponses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress. *Aquaculture*, 156:279-90.

ROUBAL, F. R. 1986. Blood and other possible inflammatory cells in sparid *Acanthopagrus australis* (Günther). *Journal of Fish Biology*, 28:573-593.

RUDOLPH, F. B.; KULKARNI, A. D.; FANSLOW, W. C.; PIZZINI, R. P.; KUMAR, S.; BUREN, C. T. 1990. Role of RNA as dietary source of pyrimidines and purines in immune function. *Nutrition*, 6:45-52.

SADO, R. Y.; MATUSHIMA, E. R. 2008. Histopathological, immunohistochemical and ultraestrutural evaluation of inflammatory responsein *Arius* genus Fish under experimental inoculation of BCG. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 51(5):929-935.

SALVADOR, R. 2008. *Imunização e inflamação por Streptococcus agalactiae em tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) alimentadas com ração suplementada com parede celular de Saccharomyces cerevisiae*. 128 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SAKABE, R. 2007. *Suplementação alimentar com ácidos graxos essencias para tilapia do Nilo: desempenho produtivo, hematologia e granuloma por corpo estranho*. 63 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SAKAI, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture,* 172(1-2):63-92.

SANTOS, L. R.; OLIVEIRA, C. 2007. Morfometria testicular durante ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). *Revta Brasil. Zool.*, 24:67-70.

SARGENT, J. R.; HENDERSON, R. J.; TOCHER, D. R. 1989. The lipids. In: HALVER, J. E. (Ed.). *Fish Nutrition*. New York: Academic Press, p. 154-218.

SATAKE, T.; NUTTI-SOBRINHO, A.; PAULA-LOPES, O. V.; LOPES, R. A.; LEME-SANTOS, H. S. 1989. Estudo hematológico de peixes brasileiros. XI. As células brancas do cascudo *Hypostomus paulinus* Ihering 1905 (Pisces, Loricariidae). *Ars Veterinaria*, 5:107-111.

SATAKE, T.; OGASAWARA, T.M.; LOPES, R.A.; BRENTEGANI, L.G.; WATANABE, L.S. & SALA, M.A. 1994. Estudo hematológico de peixes brasileiros. XVIII. Morfologia dos leucócitos de surubim *Pseudoplatystoma corruscans* Agassis, 1829 (Pisces: Pimelodidae). *Rev. Esc. Farm. Odont., Alfenas*, 16: 31-38.

SAUNDERS, D. C. 1966. Differential blood cell counts of 121 species of marine fishes of Puerto Rico. *Trans. Amer. Microsc. Soc.*, 8:427-449.

SCAPIGLIATI, G.; ROMANO, N.; ABELLI, L. 1999. Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T and B–lymphocytes. *Aquaculture*, 172:3-28.

SCHOBER, A.; MALZ, C. R.; MEYER, D. L. 1993. Enzymehistochemical demonstration of nitric oxide synthase in the diencphalon of the rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*). *Neuroscience Letters*, 151:67-70.

SCHOOR, W. P.; PLUMB, J. A. 1994. Induction of nitric oxide synthase in channel catfish *Ictalurus punctatus* by Edwardsiella ictaluri. *Dis. Aquat. Org.*, 19:153-155.

SCHÜTT, D. A.; LEHMANN, J.; GOERLICH, R.; HAMMERS, R. 1997. Haematology of swordtail, *Xiphophorus helleri*. I: blood parameters and light microscopy of blood cells. *J. Appl. Ichthyol.*, 13:83–89.

SEALEY, W. M.; GATLIN, D. M. 2002. Dietary vitamin C and vitamin E interact to influence growth and tissue composition of juvenile hybrid striped bass (*Morone chrysops* (female) x *M. saxatilis* (male)) but have limited effects on immune responses. *J. Nutrition*, 132(4):748-755.

SECOMBES, C. J. 1996. *The fish immune system - the nonspecifis immune system: celular defenses.* [S.l.]: Academic Press, p.63-103.

SECOMBES, C.; FLETCHER, T. C. 1992. The role of phagocyte in the protective mechanisms of fish. *Amnual Review of Fish* Disease, 2:53-71.

SEGAL, A. W.; ABO, A. 1993. The biochemical basis of NADPH oxidase of phagocytes. TIBS, 18:43-47.

SHIAU, S. Y.; HSU, C. Y. 2002. Vitamin E sparing effect by dietary vitamin C in juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Aquaculture*, 210:335-342.

SHOEMAKER, C. A.; EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H. 2000. Density and dose: factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia (*Oreochomis niloticus*). *Aquaculture*, 188:229-235.

SIWICKI, A. K.; ANDERSON, D. P.; RUMSEY, G. L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 41:123-139.

SIWICKI, A. K.; MORAND, M.; KLEIN, P.; STUDNICKA, M.; TERECH-MAJEWSKA, E. 1998. Modulation of nonspecific defence mechanisms and protection against diseases in fish. *Acta Vet.* BRNO, 67:323-328.

SLIERENDRECHT, W. J.; LORENZEN, N.; GLAMANN, J.; KOCH, C.; ROMBOUT, J. H. W. M. 1995. Immunocytchemical analysis of a monoclonal antibody specific for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) granulocytes and thrombocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 46:349-360.

SMITH, C. E. 1979. The prevention of liver lipoid degeneration (ceroidosis) and microcytic anemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson), fed rancid diets: a preliminary report. *J. Fish Dis.,* 2:429-437.

STOSIK, H.; DEPTULA, W.; TRAVNICEK, M. 2001. Studies on the number and ingesting ability of thrombocytes in sick carps (*Cyprinus carpio*). *Vet. Med.*, 46:12–16.

STOSKOPF, M. K. 1993. *Fish medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 882p.

SUZUKI, K. 1986. Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas), and carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Biol.*, 29:349-364.

TAM, W. H.; FRYER, J. N.; ALI, L.; DALLAIRE, M. R.; VALENTINE, B. 1988. Growth inhibition, gluconeogenesis and morphometric studies of the pituitary and interregnal cells of acid-stressed brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Can. J. Fish. Aquatic Sc.*, 45:1197-1211.

TAVARES-DIAS, M. 2006. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. *J. Fish Biol.*, 68:1822–1833.

TAVARES-DIAS, M.; AFFONSO, E. G.; OLIVEIRA, S. O.; MARCON, J. L.; EGAMI, M. I. 2008. Comparative study on hematological parameters of farmed matrinxã, *Brycon amazonicus* Spix and Agassiz, 1829 (Characidae: Bryconinae) with others Bryconinae species. *Acta Amazonica*, 38:799-806.

TAVARES-DIAS, M.; BARCELLOS, J. F. M. 2005. Peripheral blood cells of the armored catfish Hoplosternum littorale Hancock, 1828: a morphological and cytochemical study. *Braz. J. Morphol. Sci.*, 22:215–220.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2003. Hematological evaluation of *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) captured in a fee fishing farm from Franca, São Paulo, Brasil. *Biosc J.*, 19:103–110.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2007. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. *Vet. Clin. Pathol.*, 36:49-54.

TAVARES-DIAS, M.; ONO, E. A.; PILARSKI, F.; MORAES, F. R. 2007. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. *J. Appl. Ichthyol.*, 23:709-712.

TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E. F. S.; CAMPOS-FILHO, E. 1999a. Características hematológicas do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (Osteichthyes: Characidae) em sistema de monocultivo intensivo. II. Leucócitos. *Revta Brasil. Zool.*, 16:175-84.

TAVARES-DIAS, M.; TENANI, R. A.; GIOLI, L. D.; FAUSTINO, C. D. 1999b. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros

sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) em policultivo intensivo. *Revta Bras. Zool.*, 16:423-431.

TAVARES-DIAS, M.; FRASCÁ-SCORVO, C. M. D.; MORAES, F. R.; CAMPOS-FILHO, E. 1999c. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Parâmetros eritroleucométricos, trombométricos e glicemia do matrinxã *Brycon cephalus* Günther, 1869 (Osteichthyes: Characidae). *Ars Veterinaria*, 15(3):149-153.

THOMPSON, K. D.; CACHOS, A.; INGLIS, V. 1995. Immunomodulating effects of glucans and oxytetracycline in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, on serum lysozyme and protection. In: SHARIFF, M.; SUBASIGHE, R. P.; ARTHUR, J. R. (Ed.). *Diseases in Asian Aquaculture*. Manila, Philippines: Fish Health Section, Asian Fish. Soc., 11, p. 433–439.

THOMPSON, K. D.; TATNER, M. F.; HENDERSON, R. J. 1996. Effects of dietary (n-3) and (n-6) polynsaturated fattty acid ratio on the immune response of Atlantic salmon*, Salmo salar* L. *Aquacult. Nutrition*, 2:21-31.

TIMUR, G.; ROBERTS, R. J.; McQUEEN, A. 1977a. The experimental pathogenesis of focal tuberculosis in the plaice (*Pleuronectes platessa*). *J. Comp. Pathol.*, 30:89-96.

TIMUR, G.; ROBERTS, R. J.; MCQUEEN, A. 1977b. Carrageenin granuloma in the place (*Pleuronectes platessa*) a histopathological study of chronic inflammation in a teleost fish. *J. Comp. Pathol.*, 87:83-87.

TOCHER, D. R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews Fish. Sc.*, 11:107-184.

TORT, L.; GOMEZ, E.; MONTERO, D.; SUNYER, J. O. 1996a. Serum haemolytic and agglutinating activity as indicators of fish immunocompetence: their suitability in stress and dietary studies. *Aquacult. Internat.l*, 4:31-41.

TORT, L.; SUNYER, E. G.; MOLINERO, A. 1996b. Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Sparus aurata. Vet. Immunol. Immunopathol.*, 51:179-188.

UEDA, I. K.; EGAMI, M. I.; SASSO, W. S.; MATUSHIMA, E. R. 2001. Cytochemical aspects of the peripheral bloo cells of *Oreochromis* (*Tilapia*) *niloticus* (Linnaeus, 1758) Cichlidae, Teleostei) – Part II. *Braz. J. vet. anim. Sci.*, 38:273-277.

VALE, A.; AFONSO, A.; SILVA, M. T. 2002. The professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterization of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. *Fish Shellfish Immunol.*, 13:183-198.

VEIGA, M. L.; EGAMI, M. I.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; RODRIGUES, E. L. 2000. Aspectos morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas de *Salminus maxilosus* Valenciennes, 1840 (Characiformes, Characidae). *Rev. Chilena Anat.*, 18:245-250.

VERLHAC, V.; NDOYE, A.; GABAUDAN, J.; TRROUTAUD, D.; DESCHAUX, P. 1993. Vitamin nutrition and fish immunity: influence of antioxidant vitamins (C and E) on immune responses of rainbow trout. In: INRA (Ed.). *Fish Nutrition in Practice*. Paris: INRA. (Les. Colloques, n. 61). p. 167-177.

VIJAYAN, M. M.; PEREIRA, C.; MOON, T. W. 1994. Hormonal stimulation of hepatocyte metabolism in rainbow trout following an acute handling stress. *Comp. Biochem. Physiol.*, 108C:321-329.

WAAGBO, R.; GLETTE, J.; RAA-NILSEN, E.; SANDNES, K. 1993. Dietary vitamin C, immunity and disease resistance in atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.*, 12:61-73.

WADA, S.; HATAI, K.; KUBOTA, S. 1991. Histopathological study of culture striped jack with yellow fat disease. *Fish Pathol.,* 26:61-67.

WADA, S.; HATAI, K.; KUBOTA, S. 1989. Ligth microscopical observations of culture yellotail *Serola quinqueradiata*, characterized by yellow discoloration of body surface. *Fish Pathol.*, 24:211-218.

WAHLI, T.; MEIER, W.; PFISTER, K. 1986. Ascorbic acid induced immune mediated decrease in mortality in *Ichthyophthirius multifiliis* infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Acta Tropica*, 43:287-289.

WEDEMEYER, G. 1970. The role of stress in the disease resistance of fishes. *Amer. Fish. Soc., Special Publication*, 5:30-35.

WEDEMEYER, G. A. 1997. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge: University Press, p. 35-71.

VERLHAC, V.; NDOYE, A.; GABAUDAN, J., TRROUTAUD, D.; DESCHAUX, P. 1993. Vitamin nutrition and fish immunity: influence of antioxidant vitamins (C and E) on immune responses of rainbow trout. In: INRA (Ed.), *Fish Nut. Pract.*, 61:167-177.

WIIK, R.; ANDERSEN, K.; UGLENES, I.; EGIDIUS, E. 1989. Cortisol-induced increase in susceptibility of Atlantic salmon, *Salmo salar*, to *Vibrio salmonicida*, together with effects on the blood cell pattern. *Aquaculture*, 83:201-215.

WILLIAM, R. W.; WARNER, M. C. 1976. Some observations on the stained blood cellular elements of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Fish Biol.*, 9:491-497.

WITTEN, P. E.; VILLWOCK, W.; RENWRANTZ, L. 1998. Haematogram of the tilapia *Oreochromis niloticus* (Cichlidae, Teleostei) and application of a putative phenoloxidase for differentiating between neutrophilic granulocytes and monocytes. *Can. J. Zool.*, 76:310-319.

WOO, P. T. K.; BRUNO, D. W. 1998. Fish Diseases and Disorders: viral, bacterial and fungal infections. *CABI*, 3:479-511.

WOJTASZEK, J. S. 1991. Haematology of the grass snake *Natrix natrix natrix* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100A:805-812.

YAMAMOTO, K.; MUKAMOTO, M.; WATARAI, S.; KODAMA, H.; NAKAYASU, C.; OKAMOTO, N. 2001. Induction of specific cytotoxic T-cell activity against xenogeneic target cells in carp (*Cyprinus carpio*). *J. Vet. Res.,* 62:599-603.

ZINKL, J. G.; COX, W. T.; KONO, C. S. 1991. Morphology and cytochemistry of leucocytes and thrombocytes of six species of fish. *Comp. Haemat. Internat.l*, 1:187-195.

Marcos Tavares-Dias
Organizador

Embrapa
Amapá